UNIVERSITÉ René DESCARTES de PARIS

ANNEE 1972-1973

Série E. n°270

THÈSE

présentée

A L'UNITE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHES

DES MECANISMES D'ACTION DES MEDICAMENTS ET DES TOXIQUES

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN PHARMACIE

(DIPLOME D'ÉTAT)

par

Jacqueline BONALY-CANTAREL

Titre de la thèse

L'ETUDE DU CYCLE CELLULAIRE PAR L'AUTOHISTORADIOGRAPHIE ET LA CYTOPHOTOMETRIE. APPLICATION AUX MERISTEMES RADICULAIRES D'ALLIUM SATIVUM L. NORMAUX ET SOUS L'INFLUENCE DE TROIS COMPOSES MITODEPRESSEURS.

(ANTIPYRINE, HYDRAZIDE MALEIQUE, BARBITAL)

Soutenue le 1973

JURY : M. G. DEYSSON — Président

M. J.C. MESTRE — Examinateurs

Mlle C.P. BOURNIQUE — Examinateurs

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548020_0010

UNIVERSITÉ René DESCARTES de PARIS

ANNEE 1972-1973

Série E. n°270

THÈSE

présentée

A L'UNITE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHES

DES MECANISMES D'ACTION DES MEDICAMENTS ET DES TOXIQUES

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN PHARMACIE

(DIPLOME D'ÉTAT)

par

Jacqueline BONALY-CANTAREL

Titre de la thèse

L'ETUDE DU CYCLE CELLULAIRE PAR L'AUTOHISTORADIOGRAPHIE ET LA CYTOPHOTOMETRIE. APPLICATION AUX MERISTEMES RADICULAIRES D'ALLIUM SATIVUM L. NORMAUX ET SOUS L'INFLUENCE DE TROIS COMPOSES MITODEPRESSEURS.

(ANTIPYRINE, HYDRAZIDE MALEIQUE, BARBITAL)

Soutenue le

JURY : M. G. DEYSSON — Président

M. J.C. MESTRE)
Mle C.P. BOURNIQUE) — Examinateurs

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A la mémoire de mon père

A la mémoire de mes grand-parents

A ma mère

A mon mari

A ma fille

A ma famille

A mon Maître,

Monsieur le Professeur Guy DEYSSON

Professeur à la Faculté des Sciences Pharmaceutiques

et Biologiques de l'Université René DESCARTES,

Directeur de Laboratoire à l'Ecole des Hautes Etudes,

Membre de l'Académie de Pharmacie

Officier de la Légion d' Honneur,

Qui, après m'avoir accueillie dans son laboratoire,
m'a toujours prodigué avec une très grande sollicitude
ses conseils et ses encouragements.

Qu'il trouve ici un témoignage de ma
respectueuse gratitude et de mon profond dévouement.

A Monsieur Jean Charles MESTRE

Maître de Conférences agrégé à la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'Université PARIS-SUD.

Qui me fait l'honneur de faire partie de mon Jury de thèse, en témoignage de ma sincère gratitude pour l'intérêt bienveillant qu'il m'a toujours manifesté.

A Mademoiselle Claude Pierrette BOURNIQUE

Maître de Conférences agrégé à la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'Université René DESCARTES

Qu'elle trouve ici l'expression de mon attachement et de ma profonde reconnaissance pour sa constante sollicitude à mon égard et pour l'honneur qu'elle me fait en voulant bien juger ce travail.

A Madame Monique ADOLPHE

En témoignage de reconnaissance pour les conseils précieux qu'elle m'a si souvent donnés avec tant de gentillesse.

Qu'elle trouve ici l'expression de mon attachement.

A Mesdemoiselles Germaine DAOUSE et Monique DELAGE

qui m'ont aidé dans la réalisation technique de ce travail, en témoignage de ma gratitude.

A mes Collègues et Amis.

S O M M A I R E

Pages

INTRODUCTION 1

PREMIERE PARTIE

METHODES D'ETUDES DE LA CINETIQUE CELLULAIRE 5

- INTRODUCTION 6
- Chapitre I : CHOIX DU MATERIEL ET PREPARATION 7
- Chapitre II: DETERMINATION DE LA DUREE DU CYCLE CELLULAIRE ET DE SES PHASES - CHOIX D'UNE METHODE ET TECHNIQUE 9

A. Choix d'une méthode 9

1. Méthode des cellules tétraploïdes 9
2. Méthode des cellules binucléées 10
3. Méthodes utilisant les composés radioactifs 10

a. méthode des mitoses marquées 11

b. méthode du marquage continu 13

4. DISCUSSION 14

B. Réalisation technique de la méthode des mitoses marquées 16

a. Etude bibliographique 16

1. l'incorporation du précurseur radioactif ou marquage 16
2. le prélèvement des méristèmes et leur traitement 18
3. l'autoradiographie 22
4. l'étude de la courbe 23

b. Réalisation technique 28

1. Marquage 28
2. Prélèvement et dissociation des méristèmes 29
3. Etalement de l'émulsion 29
4. Développement 30
5. Examen des lames 31

C. Réalisation technique de la méthode du marquage continu 32

Chapitre III : L' INDEX DE MARQUAGE MAXIMAL 34

1. Principe 34

2. Réalisation technique 34

Chapitre IV : ETUDE CYTOPHOTOMETRIQUE DE LA REPARTITION DES CELLULES EN FONCTION DU TAUX D' ADN 35

A. Principe de la cytophotométrie 35

B. L'appareillage 36

C. Méthodes de mesure à l'aide du cytophotomètre MPU de LEITZ - Choix d'une méthode 37

1. Méthode de la cible 38

2. Méthode de la double longueur d'onde 38

3. Discussion 39

D. La coloration 40

E. Réalisation technique 41

1. Coloration de Feulgen 41

a. préparation du réactif de Schiff 41

b. fixation 42

c. coloration 42

2. Dissociation des méristèmes 42

3. Examen des lames et expression des résultats 42

DEUXIEME PARTIE

APPLICATION A L' ETUDE DE LA CINETIQUE DES CELLULES MERISTEMATIQUES D' ALLIUM SATIVUM L. 44

INTRODUCTION 45

- Chapitre I : ETUDE DU CYCLE CELLULAIRE DES MERISTEMES D' ALLIUM SATIVUM L 46

I. Etude par la méthode des mitoses marquées 46

A. Résultats expérimentaux 46

B. Discussion 54

II. Etude par la méthode du marquage continu 56

A. Résultats expérimentaux 56

B. Discussion 57

Pages

- Chapitre II : DETERMINATION DE L'INDEX DE MARQUAGE MAXIMAL 58

- Chapitre III : ETUDE CYTOPHOTOMETRIQUE DE LA REPARTITION DES CELLULES EN FONCTION DU TAUX D 'ADN ... 61

- C O N C L U S I O N 65

TROISIEME PARTIE

ETUDE DE L'ACTION SUR LA CINETIQUE DES CELLULES MERISTEMATIQUES DE RACINES D' ALLIUM SATIVUM L DE TROIS INHIBITEURS PREPROPHASIQUES : 1' ANTIPYRINE , 1' HYDRAZIDE MALEIQUE, ET LE BARBITAL 66

INTRODUCTION 67

- Chapitre I : ETUDE DE L' ACTION DE L' ANTIPYRINE 68

A. Introduction 68

B. Etude au moyen du " test Allium " de l'action provoquée par l'antipyrine aux concentrations 0,20 % et 0,50 % 69

1. Effets en traitement direct 69

2. Effets en traitement retour 69

C. Etude des modifications du cycle cellulaire à l'aide de la méthode des mitoses marquées 70

1. Etude en traitement direct 70

2. Etude en traitement retour 75

3. Discussion 80

D. Détermination de l'index de marquage maximal 82

E. Etude des variations de la répartition des cellules en fonction du taux d' ADN 83

F. Discussion et conclusion 84

Pages

- Chapitre II : ETUDE DE L'ACTION DE l'HYDRAZIDE MALEIQUE 85

A. Introduction 85

B. Etude au moyen du " test Allium " de l'action provoquée par l'hydrazide maleïque 86

1. Effets en traitement direct pour des concentrations inférieures à 10^{-4} (0,01 g/100 cnl) ... 86

2. Effets en traitement retour 87

C. Etude des modifications du cycle cellulaire à l'aide de la méthode des mitoses marquées 88

D. Détermination de l'index de marquage maximal 90

E. Etude des variations de la répartition des cellules en fonction du taux d' ADN 91

F. Etude complémentaire 94

G. Discussion et conclusion 94

- Chapitre III - ETUDE DE L' ACTION DU BARBITAL 96

A. Introduction 96

B. Etude au moyen du " test Allium " de l'action provoquée par le barbital 97

1. Effets en traitement direct 97

2. Effets en traitement retour 97

C. Etude des modifications du cycle cellulaire étudiées à l'aide de la méthode des mitoses marquées 98

1. Etude en traitement direct 98

2. Etude en traitement retour 102

D. Etude de la durée de la phase S par la méthode du marquage continu 104

E. Détermination de l'index de marquage maximal ..... 104 bis

F. Etude des variations de la répartition des cellules en fonction du taux d' ADN 105

G. Discussion et Conclusion 107

Page

Chapitre IV : COMPARAISON DU MODE D'ACTION DE CES TROIS INHIBITEURS 110

QUATRIEME PARTIE

DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSIONS .....

RESUME DES PRINCIPAUX RESULTATS .....

BIBLIOGRAPHIE .....

TABLE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

FIGURES

	pages
1 et 2	37.2
3	37.3
4	47.2
5	48.2
6	49.2
7	56.2
8 et 9	61.2
10 et 11	61.3
12 et 13	61.4
14 et 15	61.5
16 et 17	61.6
18	71.2
19	74.2
20	76,2
21	78,2
22	81,2
23	83,2
24	89,2
25	91,2
26	92,2
27	92,3
28	92,4
29	93,2
30	99,2

FIGURES

pages

31 . . . . . 100.3

32 . . . . . 102.2

33 . . . . . 104.2

34 . . . . . 104.3

35 . . . . . 105.2

36 . . . . . 105.3

37 . . . . . 106.2

38 . . . . . 106.3

TABLEAUX

1 47

2 48

3 49

4 50

5 64

6 71

7 74

8 76

9 79

10 81

11 89

12 99

13 . . . . . 100.2

14 102

I N T R O D U C T I O N

De nombreuses études de toxicologie et de pharmacologie ont déjà été effectuées au niveau cellulaire, et, à cet effet, des tests variés ont été mis au point, sur la cellule animale comme sur la cellule végétale.

Ces tests concernent principalement la recherche et l'étude de l'activité d'un produit sur la mitose, aussi bien sur l'entrée en mitose que sur le déroulement de la mitose elle-même avec étude au niveau des chromosomes et du fuseau.

Le " test Allium " a ainsi permis à DEYSSON (29) de distinguer trois grandes classes d'effets :

- Les composés mitodépresseurs, qui inhibent l'entrée en mitose;
- Les composés mitoclasiques, qui provoquent l'inhibition du fonctionnement fusorial et conduisent à la stathmocinèse;
- Les composés chromatoclasiques, qui altèrent la chromatine et provoquent des fragmentations et des agglutinations.

Depuis longtemps on sait que les cellules passent par deux stades :

. un stade dit " de repos ", appelé " interphase ", pendant lequel le noyau ne subit pas de transformations morphologiques. A l'examen microscopique en lumière visible le noyau garde en effet la même apparence pendant toute la durée de cette phase.

. un stade de division appelé "mitose", pendant lequel le noyau est l'objet de nombreuses transformations visibles au microscope. C'est pendant ce stade que les chromosomes deviennent apparents et se clivent longitudinalement pour donner deux lots identiques de chromosomes fils.

On distingue quatre phases au cours de ce stade :

- la prophase, pendant laquelle les chromosomes deviennent visibles;
- la métaphase , au cours de laquelle les chromosomes se groupent en une plaque équatoriale et se clivent;
- l'anaphase , qui voit le regroupement des chromosomes fils aux deux pôles ;
- et la télophase , pendant laquelle les deux cellules filles se constituent.

On a longtemps pensé que c'était au cours de la mitose que l'ADN chromosomique était synthétisé, soit pendant la prophase, soit pendant la télophase.

C'est seulement en I952 que l'emploi de la spectrophotométrie en ultraviolet a permis à WALKER et YATES (I07) de mesurer la densité.optique de cellules vivantes, et ceux-ci ont pu montrer que l'interphase était loin d'être une phase de repos, mais que c'était au contraire une période de synthèse très active, des acides nucleïques notamment.

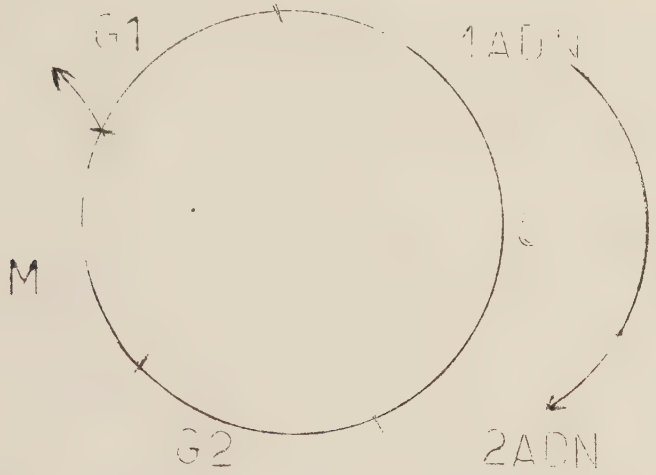
La même année, HOWARD et PELC (52 et 53), en appliquant les techniques toutes nouvelles d'autoradiographie, sont arrivés à une conclusion identique.

Ils remarquèrent d'autre part que la synthèse de l' ADN n'occupe pas toute la durée de l'interphase: elle ne débute pas immédiatement après la fin de la mitose et se termineavant le début de la mitose suivante.

Ils ont suggéré de partager la période interphasique en trois parties :

- la phase S , phase de synthèse de l' ADN
- et les phases G_1 et G_2 (du mot anglais " gap ", qui signifie intervalle), situées respectivement avant et après la phase S.

Cette succession de stades est schématisée de la manière sui vante :



En I954, L A J T H A, O L I V E R et E L L I S (59) ont reconnu à leur tour ces différents stades.

Aujourd'hui ce cycle est appelé " cycle cellulaire ", ou " cycle de génération ".

Les cellules traversent successivement les phases G_1 et G_2 avant d'entrer en division.

Les phases G1 et G2 ne sont pas non plus des phases de repos. Elles sont le siège d'activités métaboliques diverses, biosynthèse de l'ARN et des protéïnes notamment (BASERGA (5), MITCHISON (74).

Certains auteurs distinguent aussi une autre phase, appelée Go (LAJTHA, OLIVER et GURNEY (60). Cette phase est souvent assimilée à un compartiment de réserve composé de cellules qui ne parcourent pas le cycle cellulaire, mais qui peuvent entrer à tout moment dans le cycle pour remplacer une cellule blessée ou morte (CLEAVER (I9).

La découverte de l'existence de ce cycle qui est en perpétuel recommencement a ouvert une branche nouvelle en physiologie cellulaire: l'étude de la cinétique cellulaire, et le nombre d'articles et de livres à son sujet augmente chaque année.
(LAJTHA et GILBERT (58), CLEAVER (I8), LAMERTON et STEEL (6I), TUBIANA (97,98), MITCHISON (74)).

Quel est l'objet de la cinétique cellulaire ?

D'après TUBIANA et FRINDEL (99), la cinétique cellulaire permet différentes études. Parmi les principales :

- la durée de vie des cellules;
- l'origine des cellules;
- la connaissance des mouvements à l'intérieur des tissus;
- le devenir ultérieur des cellules;
- l'élaboration de lois sur la multiplication et la maturation des cellules.

Les études de cinétique cellulaire sont encore très peu utilisées en pharmacologie. Nous avons cependant pensé qu'elles pourraient apporter des renseignements susceptibles de donner quelque précision sur le mécanisme d'action de certains produits tels que les antimitotiques, et c'est dans ce but que nous avons entrepris ce travail.

Nous nous sommes dans un premier temps efforcée de mettre au point plusieurs techniques d'étude de cinétique cellulaire appliquées aux méristèmes radiculaires.

Dans une deuxième partie nous avons appliqué nos techniques à l'étude de trois antimitotiques, l'antipyrine, l'hydrazide maleïque, et le barbital, ces composés étant tous les trois des inhibiteurs préprophasiques.

Enfin, après discussion des résultats obtenus, nous nous sommes efforcée de définir la nature et les limites des résultats que peuvent fournir les techniques de cinétique cellulaire dans l'étude des effets toxiques ou pharmacologiques.

P R E M I E R E P A R T I E

METHODES D'ETUDES DE LA CINETIQUE CELLULAIRE

I N T R O D U C T I O N

Les molécules qui constituent les cellules sont en perpétuel renouvellement, sauf cependant l' A D N qui constitue le matériel dans lequel sont stockées les informations génétiques (99).

C'est sur cette stabilité des molécules d' A D N que sont basées les principales techniques d'étude de la cinétique cellulaire.

Différents types de procédés peuvent être utilisés.
Parmi ceux-ci, le plus employé est la détermination de la durée des différentes phases du cycle cellulaire par marquage d'un lot de cellules. Celles-ci peuvent alors être suivies dans le temps.

Un autre procédé qui se développe actuellement est l'étude de la répartition des cellules suivant le taux d' A D N. Cette étude utilise des méthodes cytophotométriques, et permet de classer les cellules d'une population à un instant donné dans l'un ou l'autre stade du cycle cellulaire.

Une méthode complémentaire est la détermination de l'index de marquage maximal : celui-ci représente le pourcentage des cellules qui parcourent le cycle pendant l'expérience.

Nous avons utilisé ces trois procédés, et, après une discussion des différentes méthodes employées actuellement, nous exposerons les techniques que nous avons choisies.

C H A P I T R E I

CHOIX DU MATERIEL ET PREPARATION

C'est le matériel animal qui est le plus souvent utilisé en pharmacologie et dans les études de cinétique cellulaire. Cependant, le matériel végétal est employé dans plusieurs tests, et nous l'avons préféré car il présente l'avantage d'une grande simplicité de manipulation.

Quel matériel végétal choisir ? Il est préférable d'utiliser des cellules non différenciées, les cellules différenciées ont en effet une structure assez éloignée de celle des cellules animales, et leurs réactions sont différentes.

Sont le plus souvent utilisés soit des méristèmes radiculaires provenant de graines ou de bulbes, soit des cultures de tissus végétaux.

DEYSSON (30) pense qu'il est préférable de choisir des cellules provenant de méristèmes primaires pour des études pharmacologiques: celles-ci sont en effet " très proches des cellules animales, ayant des caractéristiques ultrastructurales très voisines" .

Il écarte pour cette raison les cultures de tissus végétaux qui se font à partir de tissus méristématiques secondaires, plus différenciés.

Il explique aussi que les méristèmes radiculaires possèdent des aliments de réserve localisés soit dans le bulbe, soit dans les cotylédons s'il s'agit de graines. Ceci est un gros avantage, car le milieu de culture peut rester très simple, ce qui minimise les risques d'interaction avec le composé à étudier.

DEYSSON (27) a expliqué d'autre part pourquoi il a préféré utiliser des bulbes : une de ses raisons est que ces derniers possèdent de nombreuses racines. Les racines provenant toutes du même bulbe ont en raison de leur homogénéité génétique plus de chance d'être comparables que les racines provenant d'un lot de graines.

Nous avons utilisé des bulbes d'ALLIUM SATIVUM L. Ils sont d'une manipulation facile, et on les trouve aisément dans le commerce. En utilisant tous les bulbes provenant d'une même " tête " pour une même expérience, le nombre de racines disponibles est élevé, et ceci est un avantage lorsque de nombreux prélèvements sont nécessaires.

Pour chaque expérience, on choisit une "tête" d'ail assez volumineuse, comprenant dix bulbes au minimum. Les bulbes sont délicatement débarrassés de leurs écailles externes, et ceux qui présentent des taches ou des blessures sont éliminés.

Nous disposons ensuite ces bulbes sur des petits flacons de verre, en les maintenant par des supports de carton. Ces flacons sont remplis de solution nutritive de Knop diluée de moitié (appelée " demi-Knop").

Le milieu de Knop a la composition suivante :

- Nitrate de calcium	0,50
- Nitrate de potassium	0,I25
- Phosphate monopotassique	0,I25
- Sulfate de magnésium (7 H20)	0,I25
- Chlorure ferrique	traces
- eau distillée	Q S P I000 ml

Le demi-Knop possède un pH voisin de 5, vital pour le matériel utilisé.

Après deux à trois jours de germination à l'obscurité dans un bac thermostaté à 22° C, les racines atteignent une longueur de 1 à 2 centimètres, et sont utilisables.

On élimine tous les bulbes possédant des racines de longueur trop irrégulière.

Ce matériel très facile à utiliser possède cependant un inconvénient non négligeable : il ne germe pas en toutes saisons, et la durée des possibilités d'expérimentation est limitée.

C H A P I T R E II

DETERMINATION DE LA DUREE DU CYCLE CELLULAIRE ET DE SES PHASES - CHOIX D'UNE METHODE ET TECHNIQUE

A - CHOIX D'UNE METHODE

Il existe plusieurs méthodes permettant de déterminer la durée du cycle cellulaire et de ses phases. Elles se ramènent cependant pour la plupart à un principe général commun : les cellules sont "marquées" pendant l'un des stades du cycle cellulaire, et peuvent par la suite être reconnues lorsqu'elles parcourent le cycle. Le temps qui leur est nécessaire pour repasser par un même stade correspond à la durée du cycle cellulaire.

Les cellules peuvent être "marquées" à l'aide de substances appartenant à différentes catégories.

Parmi celles-ci, trois groupes de composés tiennent une place importante :

- les agents mitoclasiques, conduisant principalement à la " méthode des cellules tétraploïdes " -

- les agents stathmodiérétiques, qui donnent des cellules binucléées.

- les composés radioactifs, utilisés en particulier dans la " méthode des mitoses marquées".

Rappelons brièvement le principe de ces trois méthodes :

I. - METHODE DES CELLULES TETRAPLOIDES -

Le principe de cette méthode consiste à obtenir une petite population de cellules à noyau tétraploïde en ajoutant au milieu de culture pendant un temps assez bref un agent mitoclasique.

Ces cellules tétraploïdes peuvent être " reconnues " lorsqu'elles entrent en mitose.

Le temps qui s'écoule entre le traitement mitoclasique et le moment où les cellules tétraploïdes se divisent correspond à la durée du cycle cellulaire.

L'agent mitoclasique le plus utilisé est la colchicine (IOO).

Une autre méthode est également basée sur l'emploi des agents mitoclasiques, colchicine et aussi vincaleucoblastine : employés à forte dose, ils bloquent les cellules en métaphase et les empêchent de passer en anaphase; mais ils n'arrêtent pas les stades interphasiques du cycle, et les cellules étant en fin de mitose, ou dans les stades G1, S ou G2 au moment du traitement, continuent d'entrer en division. La vitesse d'accumulation des cellules en métaphase permet de mesurer le taux de production cellulaire (54,86), et de déterminer par une suite de calculs la durée du cycle cellulaire (96).

2.- METHODE DES CELLULES BINUCLEEES -

Cette méthode est très comparable à la précédente. Les cellules sont"marquées " en cours de mitose par l'absence de formation de la cloison qui sépare les deux cellules filles, si bien que l'on obtient des cellules binucléées.

L'agent le plus utilisé à cet effet est la cafeine.

Le temps qui sépare l'apparition de deux pics successifs de cellules binucléées en mitose correspond à la durée totale du cycle (46,65).

3.- METHODES UTILISANT LES COMPOSES RADIOACTIFS -

Ces méthodes sont une application de l'autoradiographie. L'autoradiographie est une technique encore récente en biologie; son principe est cependant connu depuis le début du siècle : il consiste à incorporer aux cellules un précurseur radioactif, précurseur de l' ADN * dans notre cas. Celui-ci entrera dans la composition du nouvel ADN * synthétisé.

On recouvre les cellules d'une émulsion sensible contenant de très nombreux cristaux de bromure d'argent, de taille très petite et aussi uniforme que possible.

Sous l'influence du rayonnement radioactif, il se forme une image latente, qui est développée et fixée suivant les techniques classiques. Les chromosomes contenant le précurseur radioactif sont reconnaissables par l'accumulation de points noirs, grains d'argent réduit, situés dans l'émulsion au-dessus des sites radioactifs.

Les cellules qui ont traversé la phase S au moment de l'incorporation du corps radioactif seront identifiables par ces points noirs: on dit qu'elles sont "marquées".

L'agent radioactif peut être ajouté au milieu de culture pendant un temps très court. Dans ce cas, seules les cellules qui sont en S pendant la durée du marquage seront marquées. C'est ce qu'on appelle un " marquage bref ", et celui-ci est utilisé dans la "méthode des mitoses marquées".

Le précurseur peut aussi être laissé en contact avec les cellules pendant toute la durée de l'expérience. Les cellules seront marquées au fur et à mesure qu'elles entreront dans la phase S. C'est ce qu'on appelle un " marquage continu".

a - Méthode des mitoses marquées

La méthode des mitoses marquées a été utilisée pour la première fois en 1959 par PAINTER et DREW (80), et par QUASTLER et SHERMAN (85), et en 1960 par STANNERS et TILL (92).

On réalise un marquage bref. Les cellules qui traversent la phase S pendant la durée de l'incorporation sont marquées. Ces cellules continuent de parcourir le cycle, et, lorsqu'après avoir traversé G2 elles arrivent en mitose, les figures mitotiques observées sont également marquées.

En calculant le pourcentage de mitoses marquées en fonction du temps, il est possible de suivre l'évolution de ces cellules. La durée du cycle cellulaire est égale à l'intervalle de temps qui sépare deux vagues successives de mitoses marquées.

En établissant un graphique, on peut d'autre part lire directement les valeurs des autres paramètres du cycle (CLEAVER (20)).

Le pourcentage de mitoses marquées est reporté sur l'axe des ordonnées, et le temps sur l'axe des abscisses.

Dans le cas théorique le plus simple où toutes les cellules parcourent le cycle à la même vitesse et d'une façon très régulière, la courbe a l'allure suivante (d'après C L E A V E R (20)).

Il n'ya aucune mitose marquée pendant tout le temps mis par les cellules marquées pour traverser G2.

Le pourcentage commence à augmenter lorsque les cellules qui étaient en fin de S au moment du marquage entrent en mitose. Il atteint I00 % lorsque ces premières cellules ont parcouru toutes les phases de la mitose.

Le temps mis par les premières mitoses marquées pour passer de 0 % à I00 % représente la durée de la mitose (M).

Le pourcentage reste ensuite à I00 % pendant un temps égal à la durée de S. En effet, arrivent successivement en mitose toutes les cellules qui étaient en phase S pendant le marquage. Il faut cependant déduire la durée du marquage L.

Il se produit une diminution du pourcentage lorsque les cellules qui étaient en début de S au moment de l'incorporation sont en mitose, celles qui étaient en fin de synthèse ayant terminé alors leur division. Le pourcentage devient nul lorsque les dernières cellules marquées quittent la mitose.

Le pourcentage reste ensuite nul pendant un certain temps : la population de cellules marquées est en interphase, et ce sont les cellules qui étaient en G1 et en mitose au moment du marquage qui entrent successivement en division, ces cellules ne sont pas marquées.

Se divisent ensuite les cellules qui étaient en G2 pendant l'incorporation, et qui, après avoir parcouru le cycle en entier, sont repassées par la phase G2 du cycle suivant. Ces cellules ne sont pas marquées, et le pourcentage est toujours nul.

Reviennent enfin en division les cellules qui étaient en phase S au moment du marquage, et qui sont repassées par la phase S du deuxième cycle après avoir parcouru tous les stades du premier cycle. Ces cellules sont marquées, et on assiste à une deuxième vague de cellules marquées en division. Le temps qui sépare ces deux vagues de mitoses marquées correspond à la durée du cycle cellulaire.

b. Méthode du marquage continu -

L'incorporation est poursuivie pendant toute la durée du cycle, de façon à ce que toutes les cellules qui parcourent le cycle soient marquées.

Cette méthode permet de calculer la durée du cycle cellulaire et de ses différentes phases (CLEAVER (20)).

En établissant la courbe du pourcentage des mitoses marquées en fonction du temps, on connaît la durée de la phase G2.

Pour déterminer la durée de la phase S, on compte le nombre de grains par cellule interphasique en fonction du temps : le maximum de thymidine tritiée qu'une cellule puisse incorporer correspond à une réplication complète d'ADN, et cela demande toute la durée de S. Un maximum de grains sera donc trouvé sur les cellules étant au début de S au moment de la mise en contact avec le précurseur radioactif, et ayant parcouru toute la phase S. Le temps écoulé pour obtenir ce maximum représente la durée de S.

On établit enfin le pourcentage de cellules interphasiques marquées en fonction du temps : ce pourcentage atteint une valeur maximale de IOO % lorsque toutes les cellules interphasiques sont marquées. Ceci est réalisé lorsque les cellules qui étaient en G1, G2 et M au début du marquage ont toutes atteint S, et la durée écoulée avant d'atteindre IOO % représente " G1 + G2 + M ".

La durée de S n'est pas comprise dans cette valeur puisque dès le début du marquage toutes les cellules parcourant la phase S sont marquées.

La durée totale du cycle cellulaire est alors calculée en additionnant ces paramètres :

$$T = G1 + G2 + M + S$$

4. - D I S C U S S I O N

Quels sont les avantages et les inconvénients de ces différentes méthodes ?

Les deux premières techniques des cellules tétraploïdes et des cellules binucléées présentent l'avantage que les cellules ne sont jamais exposées aux rayonnements radioactifs. Cependant, elles permettent de calculer uniquement la durée T du cycle cellulaire, et ceci est un inconvénient : il est plus intéressant de connaître l'évolution des différentes phases du cycle.

La méthode utilisant un marquage continu présente l'avantage d'un minimum de manipulation du matériel. Le précurseur est en effet ajouté au début de l'expérience, et il n'y a pas d'opération de lavage et de changement de milieu comme dans le cas d'un marquage bref.

Par contre, elle présente l'inconvénient d'une longue exposition aux rayonnements radioactifs, ce qui est nocif pour les cellules, et peut entraîner l'apparition d'anomalies de divers types (CLEAVER (I9)).

D'autre part, la durée de la phase S appréciée par cette méthode est une approximation. En effet, certaines cellules marquées commencent à se diviser, et les cellules filles contiennent la moitié du marquage de la cellule mère (CLEAVER (20)).

On obtient de ce fait une valeur pour S un peu exagérée. Ceci se répercute sur la durée de T qui est calculée à partir de S.

Pour pallier cet inconvénient, certains auteurs incorporent deux précurseurs différents l'un après l'autre : thymidine tritiée et thymidine au ^{14}C par exemple (WIMBER et QUASTLER (IIO)).

Cette méthode présente aussi le désavantage de la nécessité d'un nombre élevé de numérations pour déterminer tous les paramètres du cycle.

La méthode des mitoses marquées qui utilise un marquage bref possède aussi quelques inconvénients : la réalisation expérimentale est assez longue et délicate; là aussi, les cellules sont soumises au rayonnement radioactif.

Cependant, l'incorporation a lieu pendant un temps très court, ce qui minimise les effets causés par le rayonnement. La technique permet d'autre part d'obtenir de nombreuses données sur le cycle cellulaire.

Pour toutes ces raisons, nous avons préféré cette dernière méthode aux autres.

Il faut se poser cependant une question : est-ce que ces différentes méthodes donnent une même valeur pour la durée du cycle cellulaire ?

Une étude comparative de la méthode à la colchicine et de la méthode des mitoses marquées a été faite en I965 par VAN'T HOF (I00).

Ces deux techniques lui ont donné des résultats différents : il indique que la durée de T mesurée par la méthode des mitoses marquées est I,4 fois plus longue que dans le cas de la méthode à la colchicine. Il ajoute que cette différence est dûe à la phase G_1. VAN'T HOF avance deux hypothèses pour expliquer cela :

- L'allongement de la durée du cycle pourrait être dû au rayonnement β du tritium.

- La deuxième hypothèse est basée sur la possibilité que la colchicine et la thymidine tritiée marqueraient deux populations de cellules d'activité mitotique différente.

Il faut en conclure que l'on ne peut comparer entre eux que des résultats provenant de la même méthode.

Lorsqu'une autre source de renseignements s'est montrée nécessaire, nous avons préféré utiliser la méthode du marquage continu, plus proche de celle des mitoses marquées.

B - REALISATION TECHNIQUE DE LA METHODE DES MITOSES MARQUEES

Cette méthode peut se diviser en plusieurs parties :

- L'incorporation du précurseur radioactif ou "marquage"
- Le prélèvement des méristèmes et leur traitement
- L'autoradiographie
- L'étude de la courbe

a - Etude bibliographique

1. L'incorporation du précurseur radioactif, ou " marquage "

Un des premiers éléments radioactifs utilisés pour marquer les matériaux chromosomiques fut le ^{32}P. HOWARD et PELC (52) en I95I l'incorporent sous forme de Na H2 PO4. En I954, LAJTHA et COLL. (59) utilisent le ^{14}C et le ^{32}P.

Actuellement , le tritium est l'un des traceurs les plus utilisés. On l'incorpore sous forme de thymidine tritiée. Cette dernière ajoutée au milieu de culture, entre dans le "pool" cellulaire, passe sous forme de thymidine phosphate, et est utilisée dans la réplication de l' ADN.

Le tritium émet des rayons β de faible énergie, condition nécessaire pour une bonne résolution.

CLEAVER (I9) définit l'activité de la thymidine tritiée par trois paramètres :

- la concentration totale de l'ensemble thymidine plus thymidine tritiée
- l'activité spécifique
- l'activité par unité de volume

Ces paramètres sont reliés de la façon suivante.

$$\text{concentration totale molaire} = \frac{\text{activité par unité de volume } (\mu ci/ml \times 10^6)}{\text{activité spécifique } (Ci / m\ Mole)}$$

La concentration totale molaire détermine le taux d'incorporation dans le pool de l'ensemble thymidine plus thymidine tritiée.

L'activité spécifique détermine la fraction de nucléoside incorporé qui est marquée.

L'activité par unité de volume détermine le taux d'incorporation de thymidine marquée dans le pool.

CLEAVER mentionne que pour définir correctement les conditions expérimentales, il faut donner au moins deux de ces paramètres :

On indique généralement l'activité par unité de volume (en µci / ml), appelée aussi " concentration ", et l'activité spécifique (en Ci / m Mole).

La concentration choisie doit être faible pour éviter au maximum les effets radiobiologiques dûs au rayonnement radioactif. Il faut qu'elle soit cependant suffisamment élevée pour donner lieu à un marquage lisible. Elle est généralement de l'ordre de quelques µci/ml.

Il est préférable d'autre part d'utiliser une solution d'activité spécifique assez élevée. En effet lorsque l'activité spécifique est faible, pour une même activité par unité de volume, la concentration molaire en thymidine doit être plus élevée; et la thymidine à forte concentration risque de provoquer des pertubations métaboliques.

Dans cette méthode, le marquage est bref. Certains auteurs , (QUASTLER et SHERMAN (85) et TAYLOR (95) sur matériel animal , JONA (57) sur matériel végétal) utilisent des temps très courts de IO à I5 minutes. Mais une durée de 30 minutes est plus généralement adoptée.

Le matériel est ensuite lavé avant d'être remis sur du milieu de culture neuf.

JONA (57) effectue ce lavage avec de l'eau du robinet ; ADOLPHE (1) lave trois fois ses cultures de cellules animales avec une solution concentrée de thymidine non radioactive (appelée thymidine "froide" par comparaison avec la thymidine tritiée appelée thymidine " chaude ".

Quel est l'intérêt de la thymidine froide ?

CLEAVER et HOLFORT (2I) ont incorporé de la thymidine tritiée pendant IO minutes, et ils ont remarqué que le pool cellulaire n'était pas encore complètement épuisé après 3 à 4 heures.

Par contre, lorsqu'après le marquage, ils ajoutent de la thymidine froide à forte concentration, la thymidine radioactive du pool acido-soluble n'est plus incorporée dans les mêmes proportions, la radioactivité résiduelle étant en effet diluée.

Ceci est un avantage, car dans notre technique le marquage doit être bref.

Certains auteurs ne sont cependant pas de cet avis : EVANS (38) a montré que, sous l'action de la thymidine froide, une petite fraction seulement du pool est perdue pour les cellules. La " montée " de l'ADN marqué est retardée, mais il n'y a pas de modification dans le niveau final atteint.

EVANS pense que la réserve du pool est peu importante, et que si l'on n'ajoute pas de thymidine froide, cette réserve est utilisée dans les quelques minutes qui suivent le marquage. Par contre, sous l'action de la thymidine froide, le contenu du pool n'est pas immédiatement utilisé, mais est lentement épuisé. Dans ces conditions la thymidine marquée est encore incorporée dans la synthèse de l' ADN 40 minutes après le marquage.

Il en conclut que, du moins dans le cas des cellules méristématiques de Vicia faba L., le traitement à la thymidine froide devrait être écarté.

Beaucoup d'auteurs indiquent qu'ils effectuent un lavage après le traitement à la thymidine tritiée, mais les publications manquent généralement de précision (3,66,70,I09) - Il semble que le lavage à l'aide d'une solution de thymidine froide ne soit pas très courant.

2.- Le prélèvement des méristèmes et leur traitement.

Les prélèvements doivent être faits à intervalle régulier. Des prélèvements rapprochés donnent une meilleurs estimation dans le tracé de la courbe.

Les prélèvements se font généralement de 2h en 2h, et l'expérience est poursuivie pendant 30 à 40 H., de façon à obtenir une deuxième vague de mitoses marquées.

Les méristèmes prélevés sont immédiatement fixés, puis colorés pour l'observation.

Différents fixateurs peuvent être employés - JONA (57) , ainsi que GRANT et HESLOT (47), utilisent un mélange d'acide osmique, d'acide chromique, et d'eau distillée. Mais il semble que la solution composée de trois parties d'éthanol pour une partie d'acide acétique glacial soit d'un emploi plus fréquent (VANT HOF (I00)).

Les méristèmes entiers sont le plus généralement colorés avec le réactif de Schiff pendant deux à trois heures, après une hydrolyse préalable dans une solution d' HCl N à 60° C d'une durée variant de quinze à quarante minutes suivant le matériel végétal utilisé.

D'autres colorants sont parfois employés, en particulier des colorants acétiques tels que le carmin acétique, ou l'orceine acétique (JONA (57)). Dans ce cas, il n'est pas nécessaire de faire une fixation préalable.

Quels sont les avantages et les inconvénients de ces différentes méthodes ?

La coloration de Feulgen, demandant une fixation préalable, est longue à réaliser.

La coloration à l'orceïne acétique est par contre très rapide et nécessite un matériel réduit.

Il faut aussi penser que les préparations subiront un traitement autoradiographique : celui-ci nécessite l'application d'une émulsion sensible, et les cellules sont le plus souvent colorées avant l'application de cette émulsion. Colorer après est en effet très difficile car il ne faut pas colorer l'émulsion.

Une coloration préalable entraîne aussi quelques difficultés : la coloration palit souvent pendant le développement de l'autoradiographie, surtout lorsque l'on utilise une émulsion liquide. D'autre part, les colorants, (acides en particulier), peuvent avoir une action sur l'émulsion et modifier sa sensibilité (JENSEN (55)).

SAVAGE et PLAUT (89) ont montré que la coloration de Feulgen donne de bons résultats, sans perte de marquage. Par contre BRYANT (I5) n'a pas cette opinion : il a trouvé que l'hydrolyse acide préliminaire à la coloration de Feulgen entrainait très vite une diminution du marquage des noyaux, le marquage déplacé se réassociant avec la chromatine qui ne devrait pas être marquée.

L'emploi de l'orceïne acétique ne nécessite pas d'hydrolyse préliminaire, et ceci est un avantage. D'autre part, l'acidité de ce colorant, qui pourrait avoir une action sur l'émulsion, est très diluée étant donné les lavages effectués avant l'application de l'émulsion.

Pour ces différentes raisons, nous avons utilisé dans nos expériences cette dernière coloration.

La plupart des auteurs effectuent une dissociation (appelée " Squash " en anglais) des méristèmes entiers colorés en effectuant une simple pression entre lame et lamelle. De cette façon, toutes les cellules du méristème sont étalées en une seule couche sur la même lame.

THOMPSON et CLOWES (96) critiquent cette méthode : ils disent que la durée du cycle cellulaire mesurée par ce procédé est une moyenne de tout le méristème.

Un méristème radiculaire est constitué de plusieurs régions :

- d'une part les cellules méristématiques apicales, non différenciées, comprenant une zone de multiplication et une zone quiescente.
- d'autre part des cellules différenciées :
  - cellules de coiffe, contenant des chloroplastes et des grains d'amidon
  - cellules du cylindre central, très allongées.

Toutes ces cellules ne se comportent pas d'une façon semblable.

THOMPSON et CLOWES (96) ont établi sur des coupes de méristèmes radiculaires d' Allium sativum L la durée du cycle cellulaire pour chacune des zones méristématiques.

Ils ont obtenu les valeurs suivantes :

	T	S	M
cellules initiales de coiffe	27	I3	5
centre quiescent	I65	I7	4
Ecorce au-dessus du centre quiescent	26	I2	6
Ecorce 200 µm au dessus du centre quiescent	26	I2	6

Lorsque le méristème est dissocié, on ne peut pas, bien sûr, distinguer avec précision ces différentes zones et mesurer la durée du cycle cellulaire pour chacune de ces régions.

La valeur obtenue n'est cependant pas une moyenne du méristème entier : les cellules de coiffe, ainsi que les cellules du plérome, sont différenciées et nettement reconnaissables, et elles sont écartées lors des numérations. Les cellules du centre quiescent ne sont pas identifiables morphologiquement, mais leur nombre très faible , (THOMPSON et CLOWES (96) indiquent 30 à 50 pour un méristème radiculaire d'Allium sativum L), est négligeable par rapport au nombre élevé des cellules de l'écorce.

La durée du cycle cellulaire obtenue par dissociation correspond donc pratiquement à la durée du cycle cellulaire des seules cellules de l'écorce.

La méthode des dissociations est d'autre part beaucoup plus simple et rapide que la méthode des coupes, et elle n'a pas les inconvénients dûs à l'inclusion en paraffine.

Cependant, cette technique présente un point délicat : la dissociation est effectuée entre lame et lamelle, et cette dernière est un écran aux rayons β de basse énergie du tritium. Il est donc nécessaire de l'enlever, mais il ne faut pas entraîner en même temps une partie des cellules.

En I951, HOWARD et PELC (52) détachaient la lamelle en trempant la lame dans une solution aqueuse d'acide acétique à IO %.

GILLES (44) en I954 recommandait de tremper successivement la lame dans un mélange à parties égales d'alcool éthylique et d'acide acétique, puis dans un autre bain composé d'alcool butylique et d'acide acétique à parties égales.

Ces méthodes présentaient l'inconvénient qu'une partie des tissus, et généralement les cellules en mitose qui sont très dissociable se détachaient ou se soulevaient de la lame.

En I953, CONGER et FAIRCHILD (24) ont introduit la " méthode à la carboglace": la lame est posée directement sur un bloc de carboglace. Lorsque la préparation est congelée, la lamelle peut être enlevée très facilement, et, si la lame a été préalablement recouverte d'un adhésif tel que la gélatine, les cellules restent étroitement collées et ne se soulèvent pas.

Cette dernière méthode est pratiquement la seule employée actuellement, et nous l'avons aussi utilisée.

3.- L'autoradiographie

L'émulsion utilisée pour l'autoradiographie se présente soit sous forme de film pelliculable, soit sous forme de gel semi-liquide. Ces deux formes sont à l'origine de deux méthodes :

- la méthode du " stripping "
- la méthode du " dipping "

α.- Méthode du film pelliculable, appelée " stripping ".

C'est en 1950 que cette technique fut utilisée pour la première fois (DONIACH et PELC (35)).

L'émulsion se présente sous forme d'une mince pellicule. On la décolle de son support, et on en recouvre étroitement les lames porte-objet.

GRANT et HESLOT (47), ainsi que JONA (57) exécutent leurs autoradiographies de cette manière, à l'aide du film pelliculable KODAK AR 10.

β. - Méthode du trempage, ou " dipping ".

Cette méthode a été mise au point en 1955 par JOFTES et WARREN (56)

L'émulsion est sous forme de gel semi-liquide. On la liquéfie au bain marie à température convenable. Les lames sont alors trempées une à une dans cette émulsion. VANT HOF (102) utilise cette deuxième méthode, et emploie l'émulsion KODAK N T B.

Ces deux méthodes possèdent des avantages et des inconvénients.

La première possède l'inconvénient que la pellicule est simplement posée sur l'échantillon, et peut se déplacer sous l'action d'agents divers comme le séchage.

Elle a l'avantage que le film a une épaisseur constante sur toute sa surface, ce qui est nécessaire pour une comparaison quantitative du marquage.

Dans la technique du trempage, il est difficile de réaliser une épaisseur constante sur toute la longueur de la lame, et aussi d'une lame à l'autre. Ce défaut peut être amélioré en adoptant un rythme très régulier pour tremper les lames dans l'émulsion.

Cet inconvénient est cependant minimisé dans le cas du tritium : celui-ci a en effet une très basse énergie, et le rayonnement ne dépasse 2 µ d'épaisseur.

Un avantage de cette deuxième technique est que l'émulsion adhère fortement à la lame, les risques de glissement étant très réduits.

On trouve dans le commerce toute une gamme d'émulsions liquides ADOLPHE (1) utilise l'émulsion ILFORD K2 qui est adaptée aux rayonnements de basse énergie. C'est cette émulsion que nous avons choisie.

4 - L'étude de la courbe -

Nous avons vu dans le principe général que l'évolution des cellules marquées était suivie en établissant le pourcentage de mitoses marquées en fonction du temps.

Ceci est le plus souvent réalisé en examinant toutes les figures mitotiques, depuis les figures prophasiques jusqu'aux figures télophasiques (VAN'T HOF (IOO) MATAGNE (70)).

Il est cependant possible de se limiter à l'examen des figures d'une seule phase de la mitose, et c'est le plus souvent le stade métaphasique qui est choisi (GRANT et HESLOT (47), ARCARA et coll.(3), ADOLPHE (1).

Le stade prophasique est utilisé par MAC LEOD (66).

L'examen se limitant au stade métaphasique nous a paru présenter deux avantages principaux :

- Tout d'abord, rapidité pour effectuer les numérations : le stade métaphasique est en effet un stade bien défini, facile à repérer. Il est aussi moins long de compter uniquement les métaphases (qui représentent environ I5 % des figures mitotiques).

- D'autre part, du fait que le stade métaphasique est bien défini, le risque de compter des figures mitotiques appartenant à un autre stade est moindre. Il est en effet parfois difficile d'apprécier un tout début de prophase, une fin d'anaphase, ou un début de télophase.

Pour ces raisons nous avons, dans nos expériences, établi le pourcentage de métaphases marquées.

Les courbes expérimentales sont tracées en reportant le temps sur l'axe des abscisses, et le pourcentage de métaphases marquées sur l'axe des ordonnées.

Nous avons montré dans la première partie l'allure de la courbe théorique. Cette courbe théorique représentait en fait l'évolution d'une population où toutes les cellules se seraient comportées de la même façon. Mais ceci est un cas idéal, que l'on rencontre rarement. En réalité, les cellules parcourent le cycle à des vitesses différentes; d'autre part, le marquage se dilue avec le temps, les vagues mitotiques étant de moins en moins détectables, et les courbes expérimentales ont un aspect différent de la courbe théorique. :

- Tout d'abord, la première montée de mitoses marquées se fait d'une façon plus progressive. STANNERS et TILL (92) ont montré que cela est dû à une variation dans la durée de G2. Il n'est donc pas possible de mesurer la durée de la mitose sur cette portion de la courbe.

- La pente de la première descente est souvent plus faible que celle de la première montée. Ceci s'explique par le fait que la durée de la phase S est variable (QUASTLER et SHERMAN (85), CLEAVER (20)).

- Enfin, une variabilité de G1 et G2, compensant la variabilité de S, fait que la pente de la deuxième montée est plus élevée que la pente de la deuxième descente (CLEAVER (20)).

- D'autre part, la première montée atteint rarement 100 % du fait de la variabilité de G2 et aussi de G1 : certaines cellules qui étaient en mitose ou en G2 au moment du marquage sont en effet en retard, et certaines cellules qui étaient en G1 pendant le marquage atteignent précocement la mitose. Toutes ces cellules donnent des figures mitotiques non marquées, empêchant d'arriver au niveau 100 % de mitoses marquées (SISKEN (91)).

- De même, la deuxième montée n'atteint pas le niveau de la première. En effet, les cellules marquées qui parcourent le cycle à des vitesses différentes n'arrivent pas toutes en même temps en deuxième mitose. Enfin, les cellules marquées se sont divisées une fois et le marquage s'est dilué.

CLEAVER (20) indique qu'il est généralement possible d'obtenir deux vagues de mitoses marquées, plus rarement trois, trois étant une limite que l'on ne peut dépasser.

Tout ceci entraîne des difficultés dans la façon de mesurer la durée de ces phases.

Pratiquement, on mesure la durée des différentes phases au niveau 50 %. Dans le cas où toutes les figures mitotiques sont examinées, t_2 représente la durée de G2, plus la moitié de la durée de la mitose.

S est calculé en mesurant la distance entre les deux branches ascendante et descendante, et en retranchant la durée de l'incorporation (L).

La durée totale du cycle est la distance entre les deux branches ascendantes.

La durée de G1 se calcule par la différence T- (S+G2+M).

Nous pouvons déjà faire la remarque que la durée du cycle cellulaire mesurée de cette façon représente en réalité le temps mis par les premières cellules marquées arrivées en mitose pour traverser tout le cycle et retourner en mitose. Elle est donc l'image de la durée du cycle après la première mitose, tandis que les valeurs de S et de G2 obtenues sont les valeurs du cycle précédant la première mitose.

Lorsque l'on n'examine que les figures métaphasiques, les calculs sont un peu différents : la distance t_2 représente la durée de G2, plus la durée de la prophase plus la moitié de la durée de la métaphase $\left(G2 + P + \frac{Mét}{2}\right)$

MATAGNE (70) fait ses calculs en se basant sur ce même principe : sur la courbe du pourcentage des anaphases et télophases marquées par rapport au temps, il considère la distance t2 comme égale à :

$$G2 + \text{Prophase} + \text{Métaphase} + \frac{\text{Ana} + \text{Télo}}{2}$$

GRANT et HESLOT (47) considèrent que cette distance représente la durée de G2 plus la durée de la prophase.

Nous pensons qu'il est plus logique de considérer que la moitié de la durée de la métaphase entre aussi dans cette distance, étant donné que celle-ci est mesurée au point 50 % de métaphases marquées. La durée de la métaphase étant courte, l'erreur n'est pas très grande, mais il est préférable d'éviter le plus possible les causes d'erreur, même si elles semblent de faible amplitude.

Une autre question se pose. Dans le cas théorique où la première montée de mitoses marquées atteint 100 %, les mesures étaient faites au point 50 %.

Comme nous l'avons dit, il est assez rare que cette montée atteigne 100 %. A quel niveau faut-il alors faire les mesures, d'une part de G2 et de S, d'autre part de T ?

Il semble que la plupart des auteurs prennent le niveau d'ordonnée 50 pour les deux premières mesures (G2 et S), mais ce point n'est pas précisé assez clairement.

En 1967, VANT HOF (103) indique nettement que dans le cas où le niveau 100 % n'est pas atteint, il effectue ses mesures au niveau 50 % du pourcentage maximal. Ceci semble logique, puisque, comme nous l'avons dit, ce sont des cellules en G1 ou en G2 qui empêchent la montée des cellules marquées.

Nous avons nous aussi effectué nos mesures au demi-maximum du premier pic :

La durée de S est alors la distance séparant les demi-maximum des lignes ascendante et descendante du premier pic (moins la durée du marquage).

Nous avons vu d'autre part que, dans le cas théorique, la durée de T était représentée par la distance entre les deux branches ascendantes.

Le niveau 35 % est le plus souvent utilisé par VAN'T HOF (101), mais il n'en explique pas les raisons.

GRANT et HESLOT (47) effectuent cette mesure entre le demi-maximum du premier pic et le demi-maximum du deuxième pic.

Il se pose en effet un problème : le deuxième pic n'atteint pas le niveau du premier. Dans ce cas, prendre les mesures sur la deuxième montée au même niveau que sur la première montée surestime la durée de T. D'autre part, prendre le demi-maximum du deuxième pic semble peu logique lorsque le pourcentage le plus bas n'atteint pas 0 %.

Il faudrait mesurer T au point d'inflexion de la deuxième montée. Mais une difficulté se présente pour situer ce point : il est souvent difficile d'apprécier avec certitude le plus bas niveau atteint, ainsi que le maximum de la deuxième montée.

Pour cette raison, nous avons préféré effectuer la mesure de T au niveau 50 % de la première montée. Nos valeurs de T sont alors un peu surestimées, et nous devrons en tenir compte dans la discussion des résultats.

La durée de la phase G1 n'est pas mesurée sur la courbe. Elle est calculée par la différence :

$$T - (G2 + S + M)$$

La durée de la mitose peut être calculée de différentes manières - CLOWES en 1965 (22), ainsi que GRANT et HESTOT (47) ont proposé la relation :

$$\text{Proportion de cellules en mitose} = \frac{\text{durée de la mitose} \times 100}{\text{durée du cycle}}$$

En 1968 CLOWES (96) ajoute un facteur de correction : il considère en effet que pendant la durée d'expérimentation les cellules sont méristématiques et se divisent d'une façon asynchrone. Il calcule la durée de M d'après l'équation :

$$IM = \frac{M}{T} \log_2$$ (I M représentant l'index mitotique)

MAC LEOD (66) établit l'index mitotique et le pourcentage de cellules marquées (L I), ou index de marquage - D'après la relation $M = \frac{I M \times (S+L)}{L I}$, il calcule la durée de la mitose.

VAN'T HOF (103) établit le pourcentage de prophases marquées et de métaphases marquées en fonction du temps. Les deux courbes sont extrapolées à zéro. La distance séparant les deux points d'intersection correspond à la durée de la prophase. La durée de la mitose est alors calculée d'après la relation

$$\text{proportion de cellules en prophase} = \frac{\text{durée de la prophase}}{\text{durée de la mitose}}$$

MATAGNE (70) établit le pourcentage de prophases marquées et d'anaphases plus télophases marquées en fonction du temps, ainsi que le pourcentage de toutes les figures mitotiques marquées.

Sur la courbe des prophases marquées, il lit à 50 % du maximum la durée de " $G2 + \frac{\text{Prophase}}{2}$ "

Sur la courbe des anaphases et télophases marquées, il lit de même la durée de :

$$\text{" } G_2 + \text{Prophase} + \text{Métaphase} + \frac{\text{Ana} + \text{Télo}}{2}$$

La courbe du pourcentage des mitoses marquées lui donne d'autre part la durée de " $G2 + \frac{\text{Mitose}}{2}$ ".

Connaissant la répartition des stades mitotiques, il peut alors calculer la durée de la mitose et de ses différents stades.

Nous avons appliqué cette méthode à nos courbes. En effet, faire intervenir la durée de T ainsi que l'index mitotique nous a semblé être une source supplémentaire d'erreur. La méthode de MATAGNE est proche de la méthode employée pour lire les autres paramètres du cycle, et elle nous a semblé la plus logique.

b - Réalisation technique

1 - Marquage

Le marquage a été réalisé à l'aide d'une solution de thymidine tritiée à la concentration de 4 µci/ml de demi-Knop (C E A, activité spécifique de 4 ci /mMole à I5 Ci /mMole suivant les expériences).

Nous avons fait tremper les extrémités des racines d'ail dans cette solution radioactive pendant 30 minutes. Ce temps écoulé, les racines ont été lavées trois fois avec une solution de thymidine non radioactive (contenant IO mg de thymidine par litre de demi-knop). Puis elles ont été remises sur une solution fraîche de demi-knop (temps o).

2 - Prélèvements et dissociation des méristèmes

Nous avons effectué des prélèvements toutes les deux heures, parfois toutes les heures, pendant 30 à 38 H.

Pour chaque prélèvement, nous avons sectionné les extrémités de 5 à 6 racines que nous avons immédiatement fixées et colorées dans de l'orceïne acétique suivant la technique du test Allium (27).

Les méristèmes ont été dissociés entre une lame gélatinée et une lamelle couvre-objet.

Nous avons ensuite retiré la lamelle par la méthode à la carboglace : la lame est posée, lamelle au-dessus, sur un bloc de carboglace dont la surface a été soigneusement égalisée. Après 30 secondes à 1 minute, nécessaires pour une bonne congélation de la préparation, la pointe d'une aiguille lancéolée est glissée sous un coin de la lamelle que l'on détache d'un coup sec.

Nous avons observé quelques lamelles au microscope pour vérifier si des cellules ne restaient pas fixées sur la lamelle. Nos observations ont toujours été négatives lorsque les préparations avaient été convenablement congelées.

Les lames sont ensuite rapidement plongées dans un bain d'alcool à 95°, puis successivement dans des bains d'alcool de degrés décroissants, et dans un bain d'eau distillée, de façon à réhydrater progressivement les préparations.

Le séchage a lieu à l'air libre, à l'abri de la poussière.

3 - Etalement de l'émulsion

Cette partie de l'expérience s'effectue en chambre noire. Nous avons appliqué la technique décrite par ADOLPHE (1), en en modifiant quelques points.

Nous utilisons l'émulsion ILFORD K2 en la diluant au tiers avec de l'eau bidistillée, à la température de 42° C.

Cette dilution doit être faite avec le maximum de précautions pour éviter une éventuelle formation de microbulles.

Un tube de Borrel est rempli de cette émulsion diluée et laissé dans le bain marie réglé à 42° C pour éviter tout changement de viscosité dû au refroidissement de l'émulsion.

Il est recommandé de ne pas dépasser cette température de 42° C pour éviter l'apparition du " bruit de fond thermique " (x). Pour cette même raison, il est préférable de ne chauffer l'émulsion qu'une seule fois.

Les lames d'expérience sont plongées dans l'émulsion une par une avec un rythme aussi régulier que possible. Elles sont aussitôt redressées et placées en position légèrement inclinée sur des portoirs appropriés pendant une heure et demie, temps nécessaire pour un séchage correct de l'émulsion. Les lames sont alors rangées dans des boîtes contenant de l'actigel, et placées dans un réfrigérateur réglé à 4° C.

Le séchage est un point délicat de la technique. Si on l'accélère, il peut se produire un "bruit de fond mécanique", et l'emploi d'actigel n'est pas adopté par tous.

4 - Développement

On développe une lame après 7 jours, et, si le marquage se révèle insuffisant, on recommence un nouvel essai chaque jour. Généralement, IO jours ont été nécessaires pour l'obtention d'un marquage correct.

Les lames sont tout d'abord révélées par trempage dans le révélateur KODAK D I9, le temps de révélation étant de 5 minutes à la température de I6° C. Puis l'action du révélateur est arrêtée par un bain d'arrêt contenant de l'eau acétique. Les lames sont alors fixées dans du fixateur KODAK AL 4 pendant une durée de IO minutes.

Après deux bains de rinçage de 1 minute dans de l'eau distillée, et un bain de 5 minutes dans de l'eau ordinaire, on laisse sécher les lames à l'air libre et à température ambiante.

(x) On appelle "bruit de fond" en audoradiographie (background en anglais), la présence de grains d'argent répartis de façon plus ou moins dense et homogène dans toute l'émulsion.
Ces grains d'argent proviennent de réactions parasites sans relation avec le rayonnement radioactif : une température trop élevée entraîne l'apparition du "bruit de fond thermique". Un séchage trop rapide exerce une forte tension de la gélatine et peut provoquer l'apparition du "bruit de fond mécanique".

5.- Examen des lames

Avant toute numération, nous avons procédé à un examen minutieux des lames d'expérience pour observer l'intensité du "bruit de fond". Nous avons comparé avec des lames n'ayant subi aucun marquage.

Ceci nous a amenée à considérer comme marquée toute cellule ayant un nombre de grains supérieur à trois.

Les lames présentant un très fort "bruit de fond " ont été éliminées.

Pour chaque heure de prélèvement, nous avons établi le pourcentage de métaphases marquées en comptant I00 à I50 métaphases par méristème sur 3 à 4 méristèmes, ce qui nous a permis de tracer la courbe et de lire les paramètres du cycle au niveau 50 % du maximum.

Pour obtenir le pourcentage de prophases marquées, nous avons examiné I50 à 200 prophases par méristème.

La répartition des figures mitotiques a été déterminée en observant 300 éléments par méristème.

L'index mitotique a été calculé à la suite de l'examen de 2.000 cellules par méristème. Nous l'avons exprimé en nombre de figures mitotiques pour I000 cellules.

Pour calculer la durée de la mitose, nous avons construit la courbe du pourcentage de prophases marquées par rapport au temps, et nous avons lu au niveau 50 % de prophases marquées :

$$G2 + \frac{\text{Prophase}}{2} = A \qquad (1)$$

La courbe du pourcentage de métaphases marquées nous a donné d'autre part :

$$G2 + \text{Prophase} + \frac{\text{Métaphase}}{2} = B \qquad (2)$$

Sachant que prophase = x mitose (3)

métaphase = y mitose (4)

nous avons calculé la durée de la mitose :

En comparant (1) et (3), nous avons : $G2 + \frac{x\,M}{2} = A$

La comparaison de (2) et (4) nous conduit à la relation :

$$G2 + x\,M + y\,\frac{M}{2} = B$$

Ce qui donne :

$$M = \frac{2\,(B-A)}{x + y}$$

C - REALISATION TECHNIQUE DE LA METHODE DU MARQUAGE CONTINU -

Comme nous l'avons indiqué précédemment, nous avons utilisé cette méthode pour déterminer la durée des phases du cycle cellulaire seulement dans le cas où une source supplémentaire de renseignements s'est montrée nécessaire.

La réalisation technique de la partie expérimentale de cette méthode est tout à fait comparable à la précédente. La différence est dans le marquage qui est ici continu : les racines sont laissées continuellement en contact avec le précurseur radioactif pendant toute la durée de l'expérience. La concentration du précurseur est aussi plus facile. Nous avons utilisé pour nos expériences une solution de thymidine tritiée à la concentration de 0,5 µci / ml (C E A, activité spécifique de 4 Ci / mMole à I5 Ci /mMole).

Les prélèvements sont faits de la même façon à intervalles réguliers de 2 H.

Nous avons calculé par cette méthode la durée de la phase S.

Nous avons pour cela établi la courbe du nombre de grains par cellule interphasique en fonction du temps. Comme nous l'avons déjà dit, la phase S est entièrement écoulée lorsqu'un maximum de grains est obtenu.

Pour chaque heure de prélèvement, nous avons compté les grains de IOO cellules interphasiques sur 2 lames.

Un problème s'est alors posé : il s'agit en effet ici d'apprécier le moment où les premières cellules qui entraient en S au début du marquage quittent la phase S. Lorsque l'on numère au hasard IOO cellules marquées, ces cellules sont réparties peu de temps après le marquage sur l'ensemble de la phase S et possèdent un nombre de grains comparable. Ensuite les cellules en début de S au mo-

ment du marquage synthétisent l' ADN tout en parcourant S et sont de plus en plus marquées, mais les cellules qui étaient en fin de S passent en G2 et restent marquées tandis que d'autres passent de G1 en S et se marquent à leur tour tout d'abord de quelques grains, et ces cellules sont aussi comptées.
Il n'est donc pas logique de faire la moyenne de nos comptages ; d'autre part, les cellules marquées qui ont quitté S et qui ont un nombre maximal de grains vont augmenter le nombre moyen de grains, retardant l'arrivée du plateau.

CLEAVER (I8) estime que la durée de S obtenue par la moyenne arithmétique des grains n'est que très légèrement surestimée, mais nous avons préféré ne pas utiliser cette méthode.

D'autre part, les techniques généralement employées dans les marquages continus (moyenne géométrique, médiane (42), moyenne logarithmique (62) ne conviennent pas pour des études de cinétique pour les mêmes raisons que précédemment.

Prendre la première cellule la plus marquée n'est pas non plus possible car les cellules n'ont pas toutes la même vitesse, et nous aurions l'image de la durée minimale de la phase S.

MALONEY et Coll. (69) classent les cellules marquées par ordre croissant de grains, et prennent le nombre de grains de la cellule qui est à une place prédéterminée avant celle qui correspond à la médiane, mais ils n'expliquent pas leur méthode.

Nous avons aussi classé les cellules par ordre croissant de grains pour chaque prélèvement. En comparant les différents histogrammes, nous avons pu alors déterminér le moment où le maximum de grains était atteint par les premières cellules.

Pour tracer la courbe, nous avons retenu pour chaque prélèvement le nombre le plus élevé de grains contenus dans dix cellules au minimum. Nous avons reporté ces points sur un graphique, le temps étant indiqué sur l'axe des abscisses. La durée de S est le temps écoulé avant l'obtention d'un plateau.

C H A P I T R E III

L'INDEX DE MARQUAGE MAXIMAL

Cette méthode est plutôt une méthode complémentaire des techniques de cinétique cellulaire, mais nous la plaçons ici car elle utilise comme la précédente le marquage continu.

1.- P R I N C I P E

On appelle index de marquage maximal (IMM) le pourcentage de cellules marquées par rapport aux cellules totales à la suite d'un marquage continu d'une durée égale à la durée du cycle cellulaire.

Seront marquées dans ces conditions toutes les cellules qui auront traversé la phase S pendant la durée de l'expérience.

Cet index doit avoir une valeur de 100 % si toutes les cellules parcourent le cycle.

On associe généralement à ce nombre d'autres résultats comme l'intensité de l'incorporation de la thymidine tritiée (2).

2. - REALISATION TECHNIQUE

Le marquage continu est réalisé dans les mêmes conditions que précédemment, pendant une durée de 24 heures.

Pour établir l'index, nous avons compté 1000cellules par lame, et nous avons calculé le pourcentage de cellules marquées par rapport aux cellules totales.

C H A P I T R E IV

ETUDE CYTOPHOTOMETRIQUE DE LA REPARTITION DES CELLULES EN FONCTION DU TAUX D'ADN

A.- PRINCIPE de la CYTOPHOTOMETRIE

FIRKET en 1958 (41) définit la cytophotométrie comme "la méthode qui permet de mesurer l'absorption d'un rayonnement lumineux ou ultraviolet par des structures cellulaires dans le but d'étudier leur composition chimique".

Cette méthode a aussi un autre but : celui de doser certaines substances colorées spécifiquement.

Comment peut-on évaluer la quantité d'une substance par cette méthode ?

La photométrie d'absorption est une application de la loi de BEER-LAMBERT :

D'après cette loi, $E = K \times L \times C$ (1)

E = extinction ou densité optique
K = coefficient d'extinction
L = épaisseur du milieu coloré
C = concentration du colorant

Il existe une relation exponentielle entre l'absorption de la lumière monochromatique, et la quantité de matériel absorbant que la lumière traverse.

$$\text{LOge} \quad \frac{I}{Io} = -k\ C\ L \quad (2)$$

I étant la lumière transmise, et Io la lumière incidente.

Si l'on transforme en logarithmes décimaux :

$$\text{Log}\ \frac{I}{Io} = -K\ C\ L \qquad \left(K = \frac{k}{2,303} \right)$$

c'est-à-dire $\log \frac{Io}{I} = E$

On appelle transmission le rapport de la lumière transmise et de la lumière incidente

$$T = \frac{I}{Io}$$

L'extinction E est alors égale à $\log \frac{1}{T}$ (4)

En combinant les mesures d'absorption à des mesures de surface ou de volume, on peut calculer la quantité totale d'une substance : contenue dans une structure donnée.

Pour un objet à faces plan parallèle, la quantité de substance donnée q est égale au produit de la concentration de cette substance par le volume de l'objet.

$$q = c \times v \qquad (5)$$

Si l'on compare les équations (1) et (5), on a :

$$q = \frac{E \times v}{KL} = \frac{E \times s}{K}$$

s étant la surface de l'objet.

On obtient donc la quantité totale d'une substance colorée en multipliant l'extinction par la surface, et en divisant par le coefficient d'absorption.

Mais, dans la pratique histochimique, on se contente généralement d'une estimation de cette quantité en Unités Arbitraires (U.A) on multiplie simplement l'extinction par la surface de l'objet :

$$Q \text{ (U.A.)} = E \times s$$

Cette estimation n'est cependant valable que dans la mesure où l'on n'envisage que des études comparatives.

B. L' APPAREILLAGE

Dès I936, CASPERSSON (17) essaya d'appliquer cette méthode, mais il se heurta à de nombreuses difficultés techniques, aggravées par l'emploi de l' U.V.

Le problème fut repris en I947 en lumière visible par POLLISTER et RIS (82).

LISON et POLLISTER furent parmi les premiers à construire un cytophotomètre (I950 et 1952).

Quel est le principe d'un appareil de microphotométrie ?

Il comporte les éléments de base d'un appareil de macrophotométrie, c'est-à-dire une lampe avec des filtres permettant l'isolement d'une région spectrale étroite, ou mieux un monochromateur, et une cellule photoélectrique.

Mais ici, un microscope remplace la cuvette contenant une solution, et la photométrie est réalisée sur l'image projetée de la cellule (fig. 1 et 2).

Deux types d'appareillage sont actuellement utilisés; ils sont basés sur deux techniques de mesure différentes :

a. La mesure de la transmission est faite d'une manière globale sur la zone centrale du noyau : c'est le principe de l'appareil de POLLISTER.

b. La mesure est effectuée point par point successivement de manière à couvrir entièrement l'objet : c'est la technique du balayage, ou "scanning". Le balayage peut être obtenu automatiquement, et l'intégration de la densité optique de tous les points de l'image du noyau peut se faire électroniquement.

Nous avons utilisé pour nos mesures un cytophotomètre M P V de LEITZ, dont le principe est basé sur la première méthode de mesure.

La fig. 3 schématise cet appareil et indique le trajet des rayons lumineux.

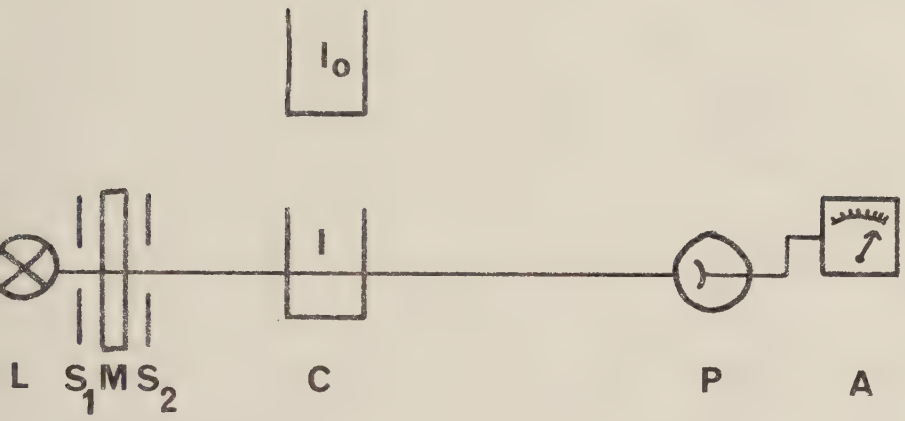
Il est important de préciser que ce microphotomètre possède un diaphragme de mesure variable, dont l'image peut être observée dans une lunette latérale : cette image se superpose à celle de l'objet à mesurer, ce qui permet de régler le champ de mesure avec facilité.

C. METHODES DE MESURE A L'AIDE DU CYTOPHOTOMETRE M P V - CHOIX D'UNE METHODE.

Le cytophotomètre M P V permet de mesurer l'absorption par deux méthodes différentes :

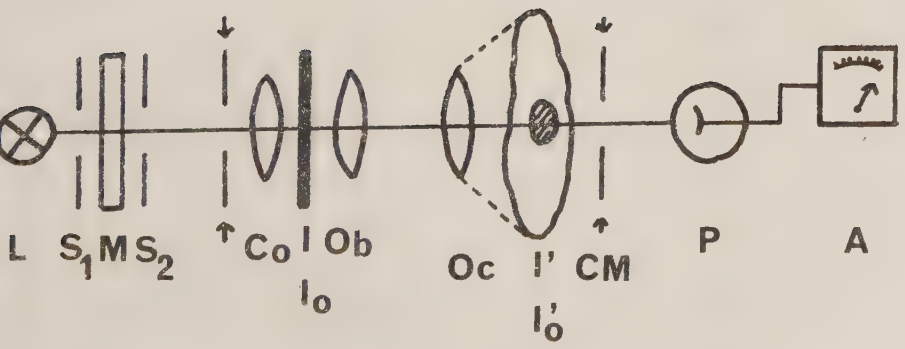
- la méthode de la cible, ou " plug "
- la méthode de la double longueur d'onde.

FIGURE 1 - MACROPHOTOMETRIE.



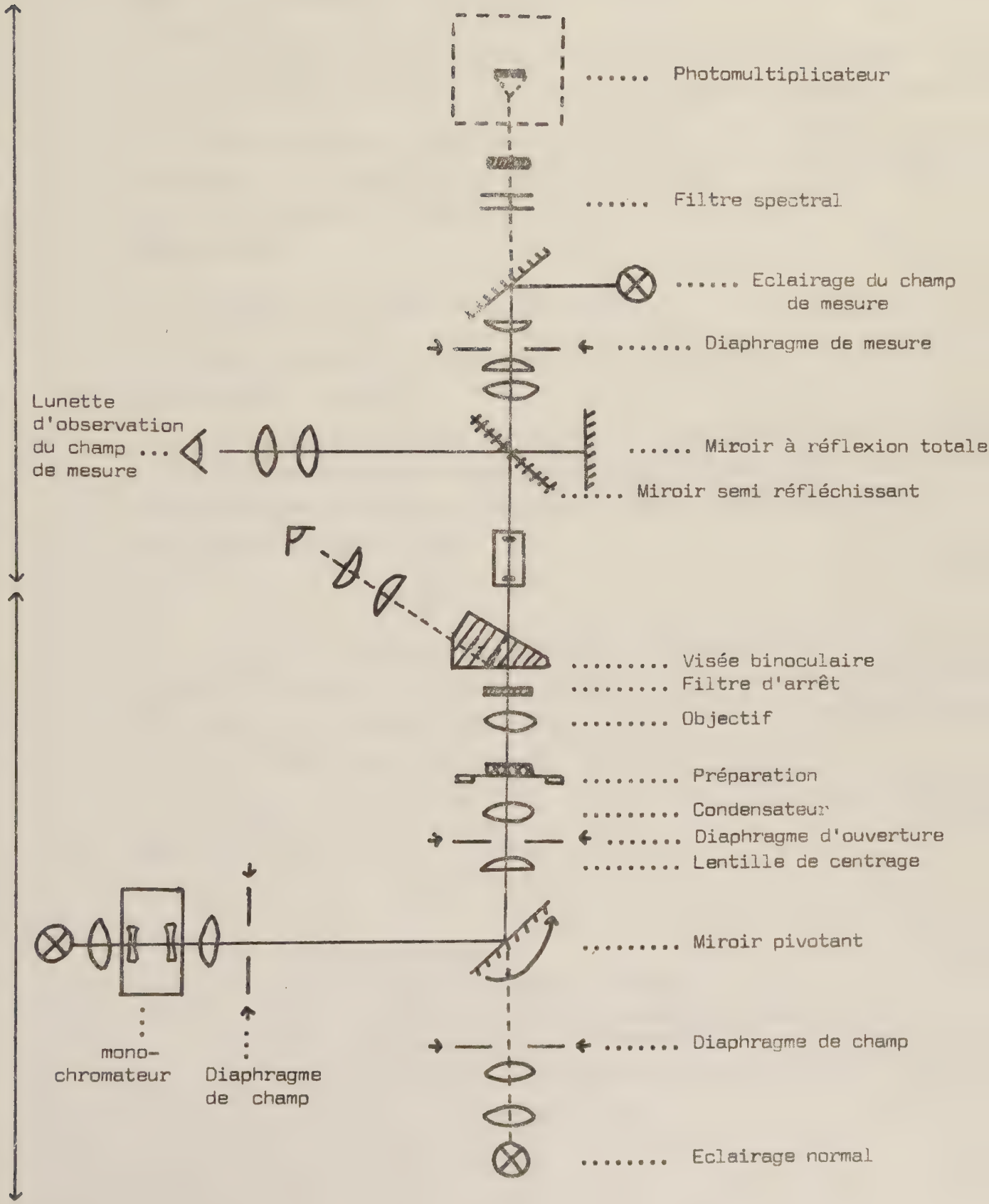
L : source lumineuse
M : monochromateur
C : cuvette
I_o : solution témoin
I : solution à mesurer
P : photomultiplicateur
A : galvanomètre

FIGURE 2 - MICROPHOTOMETRIE.



L : source lumineuse
M : monochromateur
C_o : condenseur
I : point à mesurer
I_o : espace libre
Ob : objectif
Oc : occulaire
I' : image projetée de la cellule
CM : champ de mesure
P : photomultiplicateur
A : galvanomètre

FIGURE 3 : SCHEMA DU CYTOPHOTOMETRE MPV de LEITZ.



1.- Méthode de la cible

Dans cette méthode, le champ de mesure est réduit de telle façon que l'absorption soit mesurée seulement dans la zone centrale du noyau.

La partie comprise dans le faisceau de mesure représente alors approximativement un tampon cylindrique ("plug" en anglais), (94,88).

Ce cylindre est limité par deux surfaces plan parallèle perpendiculaires à l'axe optique, et pour cette partie de l'objet l'exploitation de la mesure se fait par application de la loi de BEER-LAMBERT.

2.- Méthode de la double longueur d'onde

Cette méthode a été exposée indépendamment par PATAU (81) et ORNSTEIN (77) en I952.

La technique la plus simple est celle de PATAU : elle consiste à choisir deux longueurs d'onde telles que le rapport des deux extinctions, dans le cas d'une structure aussi homogène que possible, soit exactement égal à deux :

$$\frac{E1}{E2} = 2$$

Lorsque la même substance colorée est répartie de façon hétérogène, ce rapport est inférieur à deux : on dit qu'il est " déprimé". Ce rapport est considéré comme une sorte d' "indice d'hétérogéneité", et on l'utilise pour faire les corrections nécessaires.

Selon les calculs de PATAU, la quantité q de matière absorbante est exprimée par la relation :

$$q = K \times s \times A1 \times C$$

où K1 = constante

s = surface du champ de mesure

A1 = absorption pour la longueur d'onde correspondant à l'extinction

C = coefficient de correction qui dépend du rapport $\frac{E1}{E2}$

Pour simplifier ces calculs, MORTIMER et MENDELSOHN ont publié des tables qui indiquent directement la valeur de $A_1 C$ pour toutes les valeurs possibles de la transmission (75).

3.- Discussion

Quels sont les avantages et les inconvénients de ces deux méthodes ?

La méthode de la cible est une méthode très rapide puisqu'elle ne nécessite des mesures que pour une seule longueur d'onde.

Par contre, elle présente certains inconvénients, en particulier dans le cas où la chromatine est répartie de façon hétérogène : un matériel absorbant, distribué de façon très hétérogène, laissera passer plus de lumière que s'il était disposé en une couche homogène, et l'erreur qui en résulte peut être importante.

C'est le cas en particulier des figures mitotiques dans lesquelles la répartition de la chromatine est très hétérogène.

La méthode de la double longueur d'onde ne possède par l'inconvénient précédent : elle est applicable à des objets hétérogènes, ainsi qu'à des objets dont le volume est difficile à apprécier.

Mais elle ne possède pas que des avantages : c'est une méthode très longue, qui nécessite quatre mesures par noyau (une mesure à chaque longueur d'onde, accompagnée à chaque fois d'une mesure de "blanc").

D'autre part, cette technique dépend étroitement de mesures dans une région du spectre où l'absorption est loin d'être maximale: on risque ainsi de perdre dans l'imprécision de la mesure photométrique elle-même ce que l'on gagne d'autre part.

D'après MICHAUX (73), cette méthode est peu employée, même dans les travaux récents. Cet auteur cite les travaux de HALLET (50,51), LIST (63) et REMBUR (87).

FIRKET (41) l'utilise pour de courtes séries de mesures d'images de mitoses ou de noyaux anormaux.

Pour nos mesures, nous avons préféré appliquer la méthode de la cible, qui présente le gros avantage d'être plus rapide. C'est un fait non négligeable si l'on regarde le temps que demande chaque mesure cytophotométrique. Nous n'avons pas mesuré les figures mitotiques, trop hétérogènes.

D.- LA COLORATION

La coloration qui va servir au dosage des substances est un point très important de cette technique.

Elle doit obéir à différents critères :

- Le colorant doit être pur et doit avoir un pH convenable; la durée de la coloration doit être appropriée.
- La coloration doit être reproductible,
- La coloration doit être spécifique,
- Il ne doit pas y avoir de changement dans le maximun d'absorption,
- La coloration ne doit pas pâlir.

Deux types de coloration sont généralement utilisés :

- soit à l'aide de gallocyanine
- soit par la réaction de FEULGEN

C'est la réaction de FEULGEN qui est de loin la plus employée. Rappelons brièvement son principe (36) :

Après hydrolyse acide du tissu , il y a recoloration du réactif de SCHIFF au niveau de l'ADN : dans des conditions d'hydrolyse ménagée, seules sont solubilisées les bases puriques des polynucléotides. On obtient ainsi un composé portant exclusivement des bases pyrimidiques et que l'on appelle acide apurique. Les résidus désoxyribose démasqués peuvent alors réagir avec le leucodérivé de la fuchsine basique, formant un complexe coloré, rouge violacé, spécifique de l'ADN.

Cette méthode de coloration a été décrite pour la première fois en 1924 par FEULGEN et ROSSENBECK (40).

L'intensité de la recoloration dépend de plusieurs facteurs :

- du fixateur
- et surtout de la température, et de la durée du bain d'hydrolyse.

L'hydrolyse est classiquement réalisée dans un bain d'acide chlorhydrique normal à la température de 60° C pendant un temps fonction du matériel (de l'ordre de 10 à 40 minutes).

Cependant, DEITCH, WAGNER et RICHART (25) ont montré en 1968, en étudiant les variations de l'intensité de la coloration en fonction du temps d'hydrolyse, que, dans le cas d'une hydrolyse à 60° C, l'intensité augmente rapidement dans le temps jusqu'à un maximum qui se maintient pendant quelques minutes, puis diminue très rapidement.

Par contre, lorsque l'hydrolyse est réalisée à température ambiante dans un bain d'acide chlorhydrique cinq fois normal, la courbe atteint un maximum au bout de 20 à 40 minutes, et ce maximum se maintient en plateau pendant 1 à 2 heures.

Dans le cas d'une hydrolyse à chaud, la durée de l'hydrolyse est donc un point très délicat, et sera un facteur d'erreur. Par contre, la technique d'hydrolyse à température ambiante apporte plus de sûreté, le maximum se maintenant pendant plusieurs heures. Il est donc préférable de l'utiliser.

Il existe de très nombreuses méthodes pour préparer le réactif de SCHIFF, ainsi que pour effectuer la fixation préliminaire et la coloration (II2,4,93,48,43).

Il est évident que seules des conditions rigoureusement standardisées peuvent permettre des évaluations quantitatives.

Notre choix a porté sur une fixation et une coloration qui nous semblaient convenir en tenant compte des observations des différents auteurs.

E. - REALISATION TECHNIQUE

1. Coloration de FEULGEN

a. préparation du réactif de SCHIFF

Nous avons préparé le réactif de SCHIFF suivant la méthode préconisée par STOWELL (93) :

0,5 g de fushsine basique (KULMANN R.A.L.) sont dissous dans IOO ml d'eau distillée bouillante. La solution est filtrée après vive agitation et refroidissement à 50° C.

On ajoute au filtrat IO ml d' Hœl N et 1 g de métabisulfite de sodium, et on agite. La solution est versée dans une bouteille très propre et laissée 24 H. à l'obscurité.

On ajoute alors 0,25 g de charbon neutre activé. Après une minute d'agitation, on filtre rapidement à travers un papier filtre épais. Le filtrat qui doit être clair est conservé à l'obscurité.

Nous avons utilisé ce réactif après 3 jours et avant I4 jours.

b. fixation

Les méristèmes sont prélevés et fixés pendant 24 heures dans une solution de

- acide acétique glacial 1 part
- éthanol 3 parts

Ce fixateur est le plus généralement utilisé.

Nous avons ensuite effectué un lavage de 24 heures à l'eau courante.

c. Coloration

Nous avons effectué la coloration sur les méristèmes entiers.

Les méristèmes sont tout d'abord hydrolysés à température ambiante dans une solution d'acide chlorhydrique 5 N pendant une heure. Ils sont ensuite rincés rapidement dans une solution d'acide chlorhydrique N, puis dans de l'eau distillée.

Après ces différents rinçages, on les plonge pendant 3 heures dans le réactif de SCHIFF.

Puis ils sont rincés pendant une à deux minutes dans une solution de bisulfite de sodium à 2 %, puis à l'eau distillée.

2. - Dissociation des méristèmes

Les méristèmes entiers colorés sont posés sur une lame gélatinée, et dissociés par simple pression à l'aide d'une lamelle.

Cette dernière est ensuite enlevée par la méthode à la carboglace.

Pour obtenir une bonne dissociation, il est parfois nécessaire de la faire précéder d'un bain de 15 à 30 minutes dans une solution d'acide acétique à 45%.

3. - Examen des lames et expression des résultats

Nous avons effectué avant chaque série de mesures un réglage minutieux du cytophotomètre : le centrage est en effet un point très important qui peut être une source d'erreurs : tous les éléments du système optique (lampe, monochromateur, condenseur, objectif, diaphragme de la cellule photoélectrique, et cellule photoélectrique) doivent être rigoureusement centrés les uns par rapport aux autres.

Nous avons mesuré la transmission de 100 noyaux par méri[illegible] par la méthode de la cible, la longueur d'onde étant de 540 nm.

Pour chacun des noyaux, nous avons calculé l'extinction $E = \log \frac{1}{T_{supérieur}}$, et nous avons multiplié cette valeur par le produit des diamètres inférieur et supérieur de façon à obtenir la quantité relative d'ADN de chaque noyau. Cette quantité s'exprime en Unités Arbitraires (U.A.).

Nous avons rangé ces quantités par classes, et nous avons établi un histogramme de fréquence en portant le taux d'ADN exprimé en U.A. en abscisse et le pourcentage de noyaux en ordonnée. Chaque rectangle représenté a alors une surface proportionnelle à la fréquence.

D E U X I E M E P A R T I E

APPLICATION A L'ETUDE DE LA CINETIQUE DES CELLULES MERISTEMATIQUES DES RACINES D' ALLIUM SATIVUM L.

I N T R O D U C T I O N

Nous avons réuni dans une deuxième partie les différents résultats obtenus dans des expériences séparées de façon à pouvoir les comparer et à déterminer les paramètres de l'activité cinétique des cellules méristématiques d' Allium sativum L. dans nos conditions expérimentales telles que nous les avons exposées dans les chapitres précédents.

C H A P I T R E I

ETUDE DU CYCLE CELLULAIRE DES MERISTEMES RADICULAIRES D'ALLIUM SATIVUM L.

I - ETUDE PAR LA METHODE DES MITOSES MARQUEES

A. Résultats expérimentaux

Nous avons mené trois expériences, que nous avons appelées 1 - 2 - 3. Nous avons reporté les résultats expérimentaux de ces trois expériences dans les tableaux I, 2 et 3, les figures 4, 5 et 6 correspondant respectivement à ces tableaux.

Nous avons lu sur chaque courbe la durée des différentes phases du cycle :

	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3
$t2 = G2 + P + \frac{Mét}{2}$	7 H	9 H	6.5 H
S	11,9 H	12,1 H	
T	23 H	23,4 H	

Les valeurs de T et S, proches de 23 H et de I2 H, sont comparables. Il n'en est pas de même pour la durée de t2 qui est plus longue dans l'expérience 2.

Examinons l'allure de ces 3 courbes :

Pourcentage de métaphases marquées - Différentes heures après le marquage

Expérience I

Prélèvements	Heures après le marquage																
	2	4	6	8	I0	I2	I4	I6	I8	20	22	24	26	28	30	32	34
I	I9,5	20	30	67	68,5	86	93	94	53,3	47,6	II,6	4	24	46	28	64	23
2	I6,6	27	36	46	78	89	89,5	79	7I	43,7	I0	8,9	32,5	20	27	46	
3	I7,7	22	3I	48	82	92		84	57	60	22,8	6	27	I6	52		
4	8,7		40	54,5	75	84		85	62,3	35				36			
moyenne	I5,6	23	34,2	53,9	75,I	87,7	9I,2	85,5	60,9	46,6	I3,9	6,3	27,8	29,5	35,6	55	

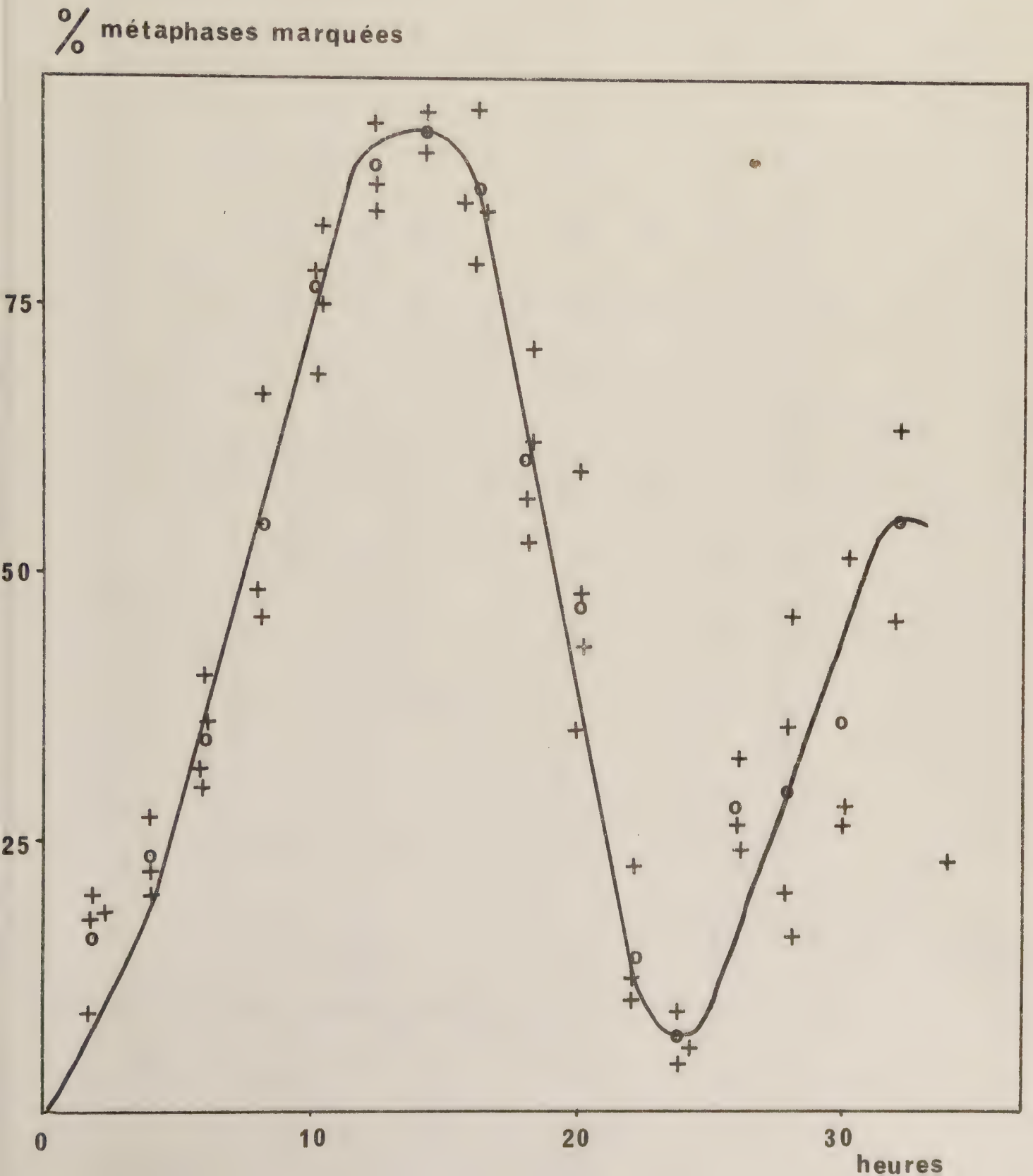
tableau n° I

FIGURE 4

Evolution en fonction du temps du pourcentage des métaphases marquées après un traitement bref par la thymidine tritiée.

Les croix représentent les valeurs déterminées dans chaque méristème.

Les cercles indiquent les moyennes correspondant à chaque prélèvement.



Pourcentage de métaphases marquées - Différentes heures après le marquage

Expérience 2

Prélèvements	Heures après le marquage													
	4	6	8	IO	I2	I4	I8	20	22	24	28	30	32	34
I	25	I4,I	I3,I	44,7	52,4	7I	5I,8	45,5	33,9	24,4	8,6	I4	37,6	4I,3
2	IO,6	2I,4	I6	37	57,9	75	60	55	40,2	26,I	I7,7	I5	34,3	43,8
3	3I,5		23,9		59,I	66,6	56,I	46,4	33,8	I8	6,I	I3,7	20,4	50
4					56,7	73,9		46,2						47,6
moyenne		I7,7	I7,6	40,8	56,5	7I,6	55,9	48,2	35,9	22,9	IO,8	I4,2	30,9	45,6

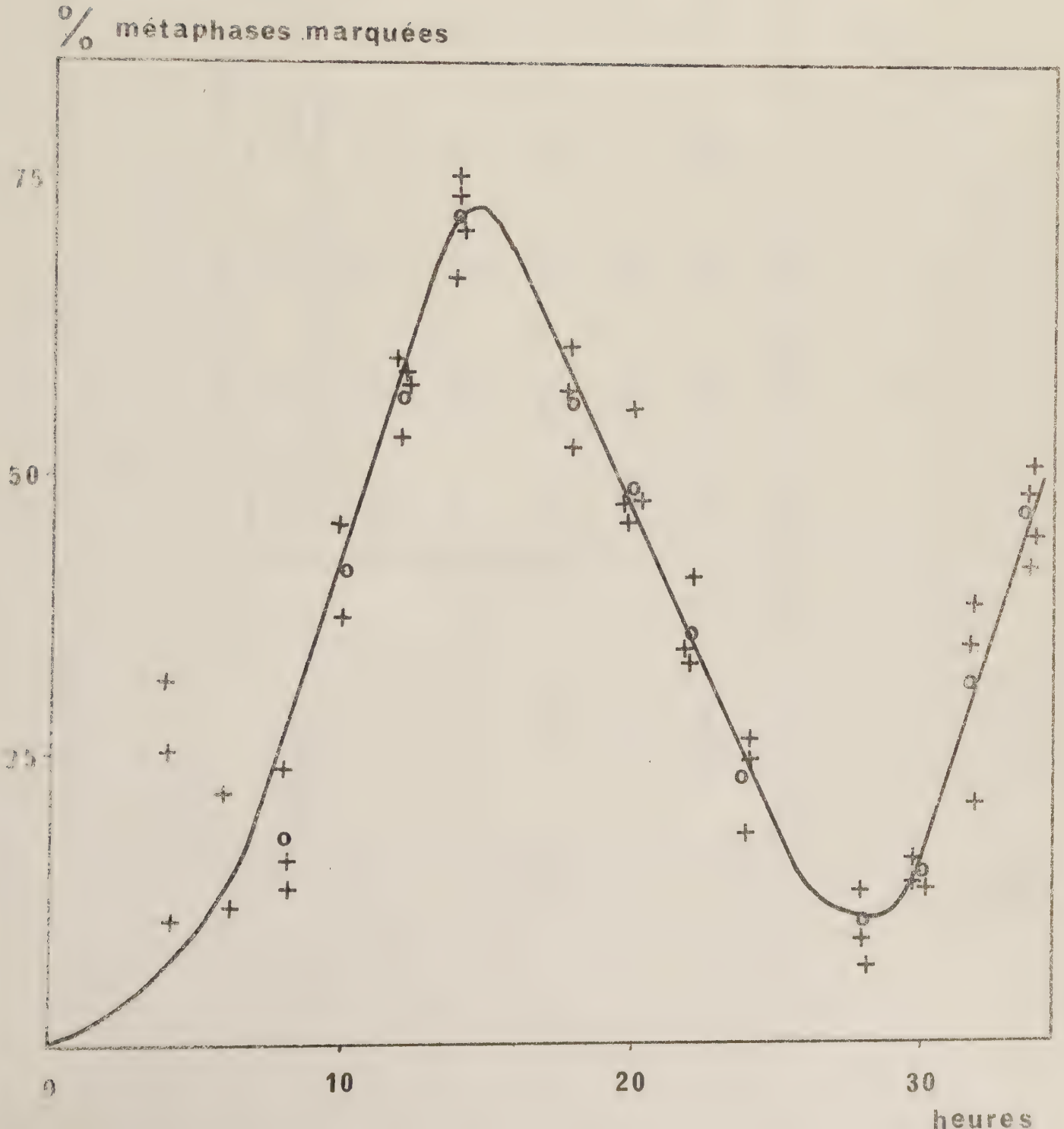
tableau n° 2

FIGURE 5

Evolution en fonction du temps du pourcentage des métaphases marquées après un traitement bref par la thymidine tritiée.

Les croix représentent les valeurs déterminées dans chaque méristème.

Les cercles indiquent les moyennes correspondant à chaque prélèvement.



Pourcentage de métaphases marquées - Différentes heures après le marquage

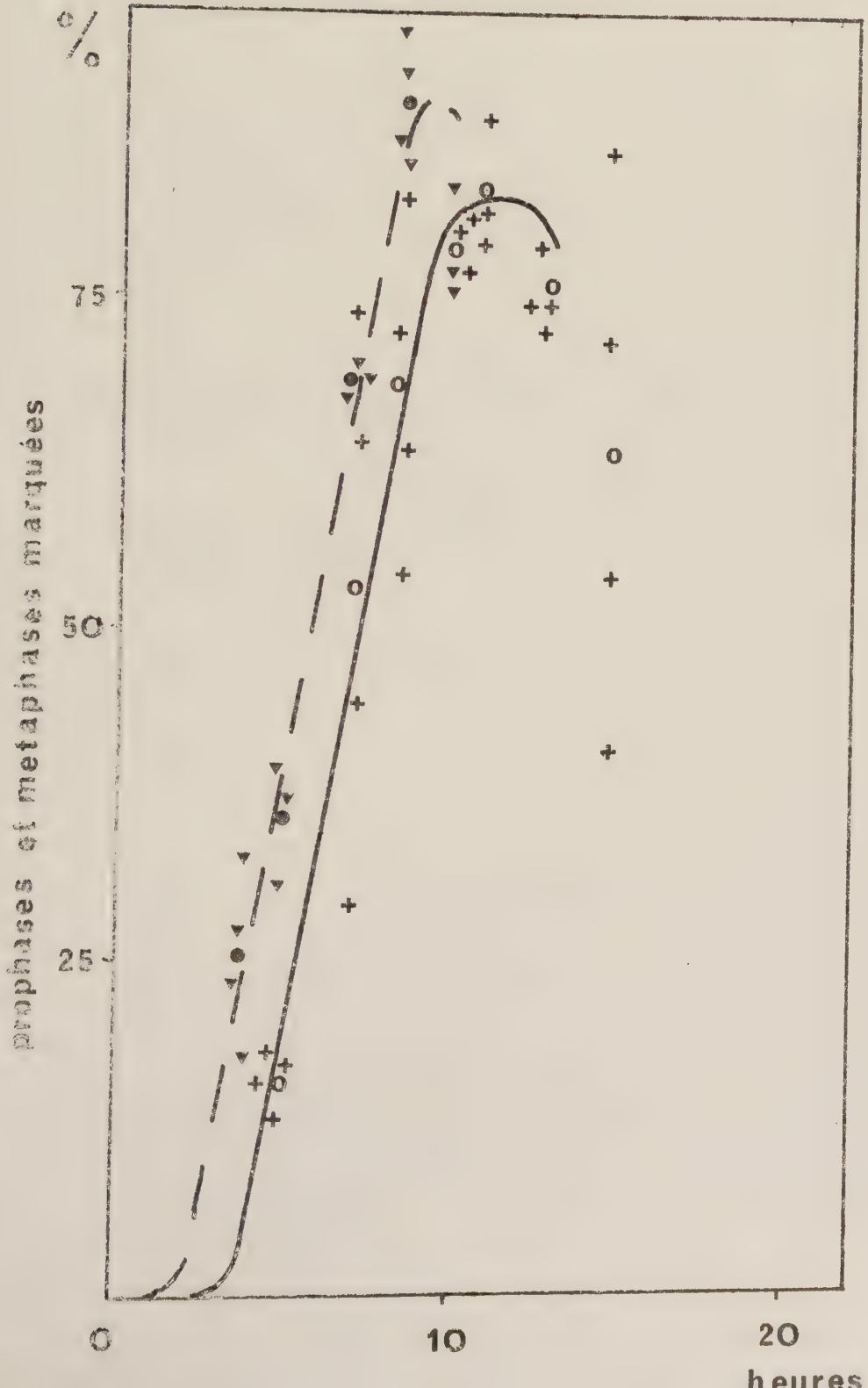
Expérience 3

Prélèvements	Heures après le marquage						
	4 H.50	7H.	8 H.20	9 H.50	IO H.50	I2 H.50	I4 H.45
I	I7,7	73,8	54,3	78,6	8I	73,7	7I,8
2	I3	64,5	82,8	79,I	82	75	4I,3
3	I7	44,8	72,2	78,5	79,2	79	86
4	I6	29,4	63,5		88	73	54,I
moyenne	I5,9	53,I	68,2	78,7	82,5	75,I	63

tableau n° 3

Evolution en fonction du temps des pourcentages de prophases (trait discontinu) et de métaphases (trait continu) marquées après un traitement bref à la thymidine tritiée.

Les triangles (prophases) et les croix (métaphases) représentent les valeurs déterminées dans chaque méristème. Les points (prophases) et les cercles (métaphases) indiquent les moyennes correspondant à chaque prélèvement.



La courbe dans le cas de l'expérience 3 a une allure assez semblable à celle de l'expérience 1; le niveau maximal atteint est cependant un peu plus faible.

Par contre, la courbe de l'expérience 2 a une allure différente.

Dans le cas de l'expérience 1, la montée des métaphases marquées est assez rapide. Celle de l'expérience 2 est plus faible. Nous avons expliqué dans le premier chapitre qu'une pente plus faible provient d'une variabilité dans la durée de G2.

D'autre part, dans l'expérience 1, la courbe atteint un niveau de 91 %, alors que le niveau atteint dans l'expérience 2 est seulement de 72 %. Cette différence peut s'expliquer par le fait que dans le deuxième cas les phases G2 et G1 présentent une plus grande variabilité, la phase G1 étant plus rapide, et la phase G2 plus lente.

Il ressort de l'examen de ces trois courbes que c'est dans l'expérience 1 que la population de cellules marquées parcourt le cycle de la manière la plus synchrone.

Nous avons pensé que ce serait une erreur de faire une moyenne de ces différents résultats, et nous avons retenu les résultats de l'expérience 1 :

$$G2 + P + \frac{Mét}{2} = 7\ H$$

$$S = 11{,}9\ H$$

$$T = 23\ H$$

Pour calculer la durée de G1 et de G2, il faut connaître la durée de la mitose.

L'expérience 3 nous a permis de calculer cette durée. Nous avons indiqué dans la première partie quatre méthodes différentes, et nous avons précisé que nous avions préféré la méthode de MATAGNE, plus proche de la méthode utilisée pour lire les autres paramètres du cycle.

Nous avons cependant calculé aussi la durée de la mitose par les autres méthodes pour comparer les résultats obtenus.

1.- Calcul d'après la méthode de MATAGNE

Nous avons expliqué page 32 comment nous avons établi une formule applicable à nos courbes pour calculer la durée de la mitose par cette dernière méthode :

$$M = \frac{2\,(B-A)}{x + y}$$

Nous avons établi dans le cas de l'expérience 3 le pourcentage de prophases marquées (tableau n°4) et le pourcentage de métaphases marquées (tableau n° 3), ceci nous permettant de tracer les courbes de la figure 6.

Nous lisons sur cette figure :

$$A = 5,2$$
$$B = 6,3$$

Sachant d'autre part que 48 % des figures mitotiques sont en prophase, et 15 % en métaphase, nous avons :

$$x = 0,48$$
$$y = 0,15$$

La durée de la mitose est donc de 3,5 H, et la durée de la prophase de 1,7 H.

2.- Calcul d'après la méthode de CLOWES

CLOWES a utilisé la formule $I\,M = \frac{M}{T} \times \log_e 2$ (page 27)

Sachant que l'index mitotique moyen est égal à 85 °/₀₀, et qu'il y a 48 prophases pour 100 figures mitotiques, la durée de la mitose est de 2,8 H , et la durée de la prophase de 1,4 H.

3.- Calcul d'après la méthode de MAC LEOD

Cet auteur établit la relation $M = \frac{IM \times (S + L)}{L\,I}$ (page 27)

Pourcentage de prophases marquées - Différentes heures après le marquage

Expérience 3

Prélèvements	Heures après le marquage				
	3 H.50	4 H.50	7 H.	8 H.20	9 H.50
I	I7,3	36,9	68,8	87	76
2	23,2	30,4	69,7	95	83,2
3	32,5	39,3	67,9	92	76,8
4	27			85	
moyenne	25	35,5	68,5	89,7	78,6

tableau n° 4

Nous avons trouvé un index de marquage moyen de 29 °/₀₀. La durée de la mitose est donc de 3,6 H, et la durée de la prophase de 1,8 H.

4.- Calcul d'après la méthode de VAN'T HOF

Cet auteur applique la relation :

$$\text{proportion de cellules en prophase} = \frac{\text{durée de la prophase}}{\text{durée de la mitose}}$$ (page 27)

En extrapolant les courbes de la figure 3, nous lisons la durée de la prophase : P = 1,3 H.

Sachant que 48 % des figures mitotiques sont en prophase, nous avons une durée de la mitose de 2,7 H

5. - discussion

Les différentes valeurs calculées d'après ces méthodes sont du même ordre de grandeur.

D'après les méthodes 2 et 4, la durée de la mitose est proche de 3 H, tandis qu'elle est proche de 3,5 H avec les deux autres méthodes.

Cependant, comme nous l'avons déjà dit, nous pensons que la méthode 1 est la plus valable pour différentes raisons :

L'index mitotique moyen intervient dans les méthodes 2 et 3. Nous avons trouvé pour cet index une valeur moyenne de 85 pour 1000, mais il n'est pas constant pendant les 36 à 40 heures d'expérience (dans le cas de l'expérience 1, il variait entre les valeurs 73 pour 1000 et 98 pour 1000 obtenues respectivement 26 H et 12 H après le marquage). Il en est de même pour l'index de marquage moyen, et nous pensons que ces deux valeurs doivent être acceptées avec réserve.

La durée de T qui entre dans la formule de la méthode 1 est mesurée sur la courbe après 36 H d'expérience, et il est probable qu'après ce laps de temps la population de cellules marquées n'est plus bien synchronisée. Il est donc délicat de faire intervenir cette valeur dans le calcul de la durée de la mitose.

La durée de S correspond aux cellules marquées traversant cette phase au début de l'expérience, celles-ci sont donc bien synchronisées, et la valeur de S peut être acceptée avec moins de réserves.

Lorsque la durée de la prophase est lue par extrapolation sur l'axe des abscisses, la valeur obtenue est minimale, et la méthode 4 conduit à une durée minimale de la mitose.

D'autre part, comme nous l'avons déjà dit, il nous semble plus logique de lire les différents paramètres au même niveau, comme dans la méthode 1.

Nous avons donc retenu pour la durée de la mitose la valeur obtenue par cette première méthode :

M = 3,5 H

Nous avons alors calculé la durée de G2 et de G1.

G2 = 5 H
G1 = 2,6 H

Avec nos conditions expérimentales, les durées du cycle cellulaire et de ses phases chez Allium sativum L. sont donc :

T	=	23 H
G2	=	5 H
S	=	11,9 H
G1	=	2,6 H
M	=	3,5 H

B.- D I S C U S S I O N

Comparons nos résultats avec les données bibliographiques : THOMPSON et CLOWES (96) ont établi la durée du cycle cellulaire et de ses phases chez Allium sativum L par régions.

Leurs résultats sont :

	T	S	G1	G2	M
cellules de coiffe	27	13	3	6	5
centre quiescent	165	17	136	8	4
Ecorce juste au-dessus du centre quiescent	26	12	4	4	6
Ecorce 200 µm au-dessus du centre quiescent	26	12	4	4	6
Rappelons nos valeurs	23	11,9	2,6	5	3,5

Nos valeurs diffèrent sensiblement de celles obtenues par ces auteurs pour l'écorce.

Ceci peut s'expliquer de plusieurs façons :

Tout d'abord les conditions expérimentales ne sont pas les mêmes : THOMPSON et CLOWES utilisent "l'eau du robinet " comme milieu de culture, et réalisent l'expérience à la température de 20° C.

D'autre part, ces auteurs se sont arrêtés à 200 µm au-dessus du centre quiescent. Nous avons dans nos prélèvements des cellules qui sont situées plus haut. Il est possible que cela entraîne des variations dans la longueur du cycle.

Nous constatons aussi que THOMPSON et CLOWES trouvent une durée de la mitose supérieure à la nôtre ; en appliquant leur relation, nous avons trouvé une valeur de 2,8 H.

L'augmentation de T ne suffit pas pour expliquer cet écart. Il semble que ces auteurs aient utilisé l'index mitotique calculé après 2 H. de traitement à la colchicine et qui est alors de 150 pour 1000. Le traitement à la colchicine augmentant la durée de la mitose, cette durée calculée ainsi ne correspond pas à la durée normale, mais est fortement surestimée.

En conclusion, si nous tenons compte de cette précédente remarque, nous pouvons dire que nos valeurs de S, de G2 et de M sont très comparables à celles de THOMPSON et CLOWES. La durée de G1 est par contre plus courte, ainsi que la durée de T.

Ceci renforce notre opinion de considérer avec réserve la valeur de T obtenue par cette méthode. Par contre, nous pensons que, lorsque l'allure de la courbe expérimentale est proche de celle de la courbe théorique, nous pouvons accepter les valeurs de G2 et de S.

Nous avons aussi comparé nos résultats avec ceux de BENBADIS (6), obtenus également avec des méristèmes radiculaires d'Allium sativum L. dans des conditions expérimentales similaires :

$T = 23\ H$
$S = 11,3\ H$
$G_1 = 3\ H$
$G_2 = 5,3\ H$
$M = 3,4\ H$

Ces valeurs sont très comparables aux nôtres, et cela nous permet de conclure que cette méthode de détermination de la durée des phases du cycle cellulaire donne des résultats satisfaisants puisque reproductibles. Nous avions d'ailleurs obtenu précédemment une conclusion semblable en déterminant la durée du cycle cellulaire des méristèmes de Pisum sativum L. (10).

II ETUDE PAR LA METHODE DU MARQUAGE CONTINU

Nous avons utilisé cette méthode dans le seul but de vérifier la durée de la phase S.

A.- Résultats expérimentaux

Nous avons réalisé un marquage continu de 20 H, et nous avons effectué des prélèvements à 2 H, 4 H, 6 H, 10 H, 12 H, 14 H, et 20 H.

Nous avons groupé les résultats sur des histogrammes (figure 7).

Au prélèvement de 20 H, le nombre maximal de grains est de 27, et, si l'on examine les autres histogrammes, on constate que ce maximum apparaît dès le prélèvement de 10 H sur une lame, puis régulièrement à partir de 12 H. La durée de S est donc comprise entre 10 H et 12 H.

F I G U R E 7

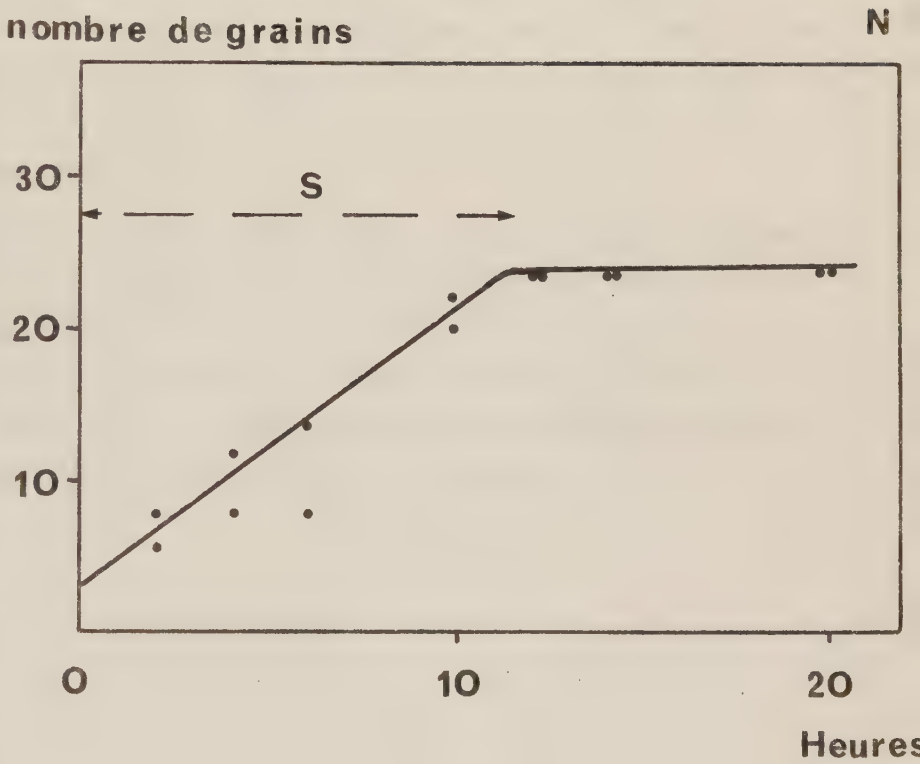
Détermination de la durée de S par la méthode du marquage continu

Les histogrammes représentent la répartition des cellules en fonction du nombre de grains.

A et B	:	2 H	de marquage
C et D	:	4 H	" "
E et F	:	6 H	" "
G et H	:	10 H	" "
I	:	12 H	" "
J et K	:	14 H	" "
L et M	:	20 H	" "

Le graphique N représente l'évolution du nombre de grains en fonction du temps.

M
L
K
J
I
H
G
F
E
D
C
B
A


nombre de grains
N
30
20
10
S
0
10
20
Heures

Si l'on reporte sur un graphique les points correspondants aux groupes des dix premières cellules ayant un nombre maximal de grains, on peut tracer la courbe représentant l'augmentation du nombre de grains en fonction du temps (figure 7) : le plateau est atteint après 11 heures de traitement, et on peut en conclure que la durée de S est comprise entre 11 H et 12 H. Il est délicat de la déterminer avec plus de précision.

B.- Discussion

Par la méthode précédente, nous avions trouvé une valeur de S de 11,9 heures. Cette valeur est comprise dans l'intervalle de 11 H et 12 H., ce qui nous permet de conclure que la méthode du marquage continu dans le cas de la détermination de la durée de la phase S donne des résultats comparables à ceux obtenus par la méthode des mitoses marquées.

Cependant, étant donné la difficulté de déterminer le moment exact où un maximum de grains est atteint, on ne peut indiquer qu'un ordre de grandeur pour la durée de S ; nous pensons que cette méthode est utile pour confirmer des résultats obtenus par la méthode précédente, mais que la méthode des mitoses marquées est préférable pour une simple détermination de la durée de S.

C H A P I T R E II

DETERMINATION DE L'INDEX DE MARQUAGE MAXIMAL

Nous avons réalisé trois expériences, et nous avons trouvé respectivement des index de marquage maximal de 60 %, 62,2 %, 64,2 %.

Après 24 heures de marquage, il y a donc seulement 60 % à 65% des cellules qui se sont marquées, c'est-à-dire qui ont traversé la phase S pendant les 24 heures de marquage.

Ce pourcentage nous a paru assez faible, et nous avons cherché à le comparer à d'autres résultats.

Nous avons en particulier déterminé l'index de marquage après un marquage bref : dans ce cas, seules les cellules en phase S au moment du marquage sont marquées. La phase S a une durée de 12 H. alors que l'ensemble du cycle dure environ 24 H. A un instant donné, on peut donc considérer que la moitié des cellules sont en phase S. Sur 100 cellules, on devrait donc trouver théoriquement 50 cellules marquées à un instant donné. Les résultats expérimentaux nous ont donné des valeurs nettement plus faibles : ils variaient entre 25 % et 35 %. A un instant donné, il y a donc en moyenne 30 % de cellules en phase S, et, comme cette phase a une durée moitié de celle du cycle, on peut considérer que le double de cellules, soit 60 % environ, parcourent le cycle.

Nous voyons que cette valeur correspond à celle obtenue par marquage continu.

Nous avons cherché à la confirmer par une autre méthode : d'après nos précédents résultats, la durée de la mitose correspond environ au 1/65 ème de la durée totale du cycle. A un instant donné, il devrait donc y avoir environ 1,5 % de cellules en mitose, ce qui correspond à un index mitotique de 150 °/₀₀ .

Or, dans nos conditions expérimentales, nos index mitotiques étaient en moyenne de 90°/₀₀, et n'ont jamais dépassé 115 °/₀₀.

Un index mitotique de 90°/₀₀ correspond à une population "active" de 58,5 %, chiffre qui est du même ordre de grandeur que les précédents.

Dans nos conditions expérimentales, il n'y a donc que 60 à 65 % de cellules qui parcourent le cycle.

Différents auteurs ont trouvé des résultats similaires : MAC LEOD a trouvé en 1968 (66) que 56,8 % de cellules méristématiques de racines latérales de Viciafaba L. suivaient un cycle correspondant à celui obtenu par la méthode des mitoses marquées (cycle court), tandis que WEBSTER en 1967 (108) en trouvait 65 %.

MAC LEOD en 1971 (68) a fait une autre étude : après un marquage bref, l'index de marquage était de 23,2 %, et il a calculé que la proportion de cellules en prolifération dans le méristème apical des racines primaires de Vicia faba L. d'une longueur de 2 m m est de 60,28 %; il indique que 39,72 % des cellules sont quiescentes, et que parmi les cellules en prolifération 40,84 % ont un cycle court.

MURIN (75) par contre trouvait 89,9 % de cellules en prolifération dans un méristème apical de racines primaires de Vicia faba pour les 1,5 premiers millimètres, dont 68,3 % avec un cycle court.

MAC LEOD a effectué une comparaison entre ses résultats et ceux de MURIN, (68); il y aurait plus de cellules quiescentes à 2mm qu'à 1,5 mm, et il soulève l'hypothèse que les cellules ayant un cycle court passent directement à l'état quiescent sans allongement intermédiaire du cycle.

Pour compléter cette question il était intéressant de faire une étude sur coupes, pour examiner les seules cellules de la zone méristématique.

CLOWES a réalisé cette étude (23) :

Il a partagé les méristèmes radiculaires de Zea [illegible] en quatre régions, et a fait une analyse après un marquage bref.

Il trouve que dans le centre quiescent, moins de la moitié des cellules se divisent, tandis que 80 à 90 % des cellules initiales de coiffe se divisent.

Dans l'écorce près du centre quiescent, 80 % de cellules se divisent, et toutes entrent en division à 200 µm du centre quiescent.

Nos méristèmes étant prélevés sur une longueur d'environ 2 mm, nos résultats semblent s'accorder avec les précédents.

On peut en conclure que par la méthode de dissociation nous observons dans nos conditions de prélèvement un ensemble de cellules dont certaines sont bien méristématiques, mais d'autres dont déjà différenciées métaboliquement bien qu'elles ne le soient pas morphologiquement, et qui ne se divisent plus.

L'index de marquage maximal semble donc lié étroitement avec la longueur de la partie prélevée. Il serait évidemment préférable de ne prélever que la zone totalement méristématique, mais celle-ci ne peut pas être localisée avec précision sur une racine entière.

Malgré cette critique, cette méthode garde cependant son intérêt car on peut constater que les valeurs que nous avons obtenues au cours d'expériences différentes sont très homogènes, toutes proches de 60 %. Ceci montre la nécessité d'un seul manipulateur pour une même expérience, un deuxième manipulateur pouvant en effet prélever des longueurs un peu différentes, ce qui donnerait des résultats hétérogènes

C H A P I T R E III

ETUDE CYTOPHOTOMETRIQUE DE LA REPARTITION DES CELLULES EN FONCTION DU TAUX D'ADN

Nous avons obtenu plusieurs histogrammes correspondant à la répartition des cellules méristématiques de racines d'Allium sativum L. en fonction du taux d'ADN, et provenant d'expériences séparées (figures 8 à 17).

Que représentent toutes ces classes ?

On sait depuis longtemps que la teneur des noyaux en ADN est proportionnelle au nombre de chromosomes dans toutes les cellules et dans tous les tissus (9).

D'autre part, au cours de la phase S, phase de réplication de l'ADN, le nombre de chromosomes double.

Théoriquement, on doit donc distinguer trois classes de noyaux :

- une classe de noyaux en G_1, possédant une teneur en ADN 2 C (du mot anglais component), correspondant à 2 n chromosomes.

- une classe de noyaux en G2, possédant une teneur en ADN 4 C, correspondant à 4 n chromosones.

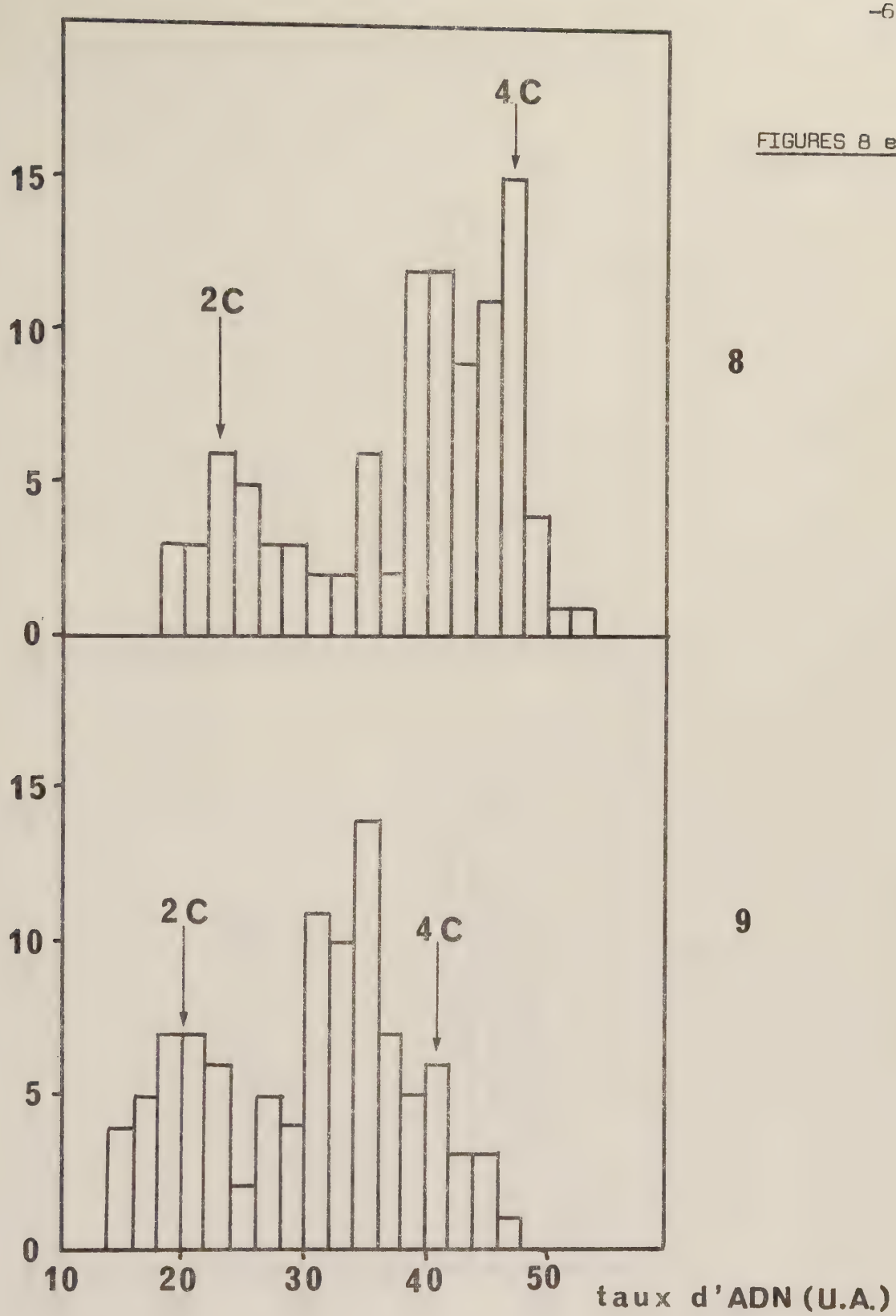
- une classe de noyaux en S, possédant des valeurs intermédiaires en ADN.

Sur nos histogrammes nous avons repéré le taux d' ADN (2C) correspondant aux cellules ayant 2 n chromosomes : il se situe au niveau du premier pic des cellules à faible teneur d' ADN.

La valeur 4 C est le double de la valeur 2 C.

Si nous examinons nos histogrammes, on remarque que beaucoup sont différents quant à leur étalement; cela est dû en grande partie aux variations de l'intensité de coloration qui dépend étroitement des conditions expérimentales. Il est donc difficile de les comparer entre eux.

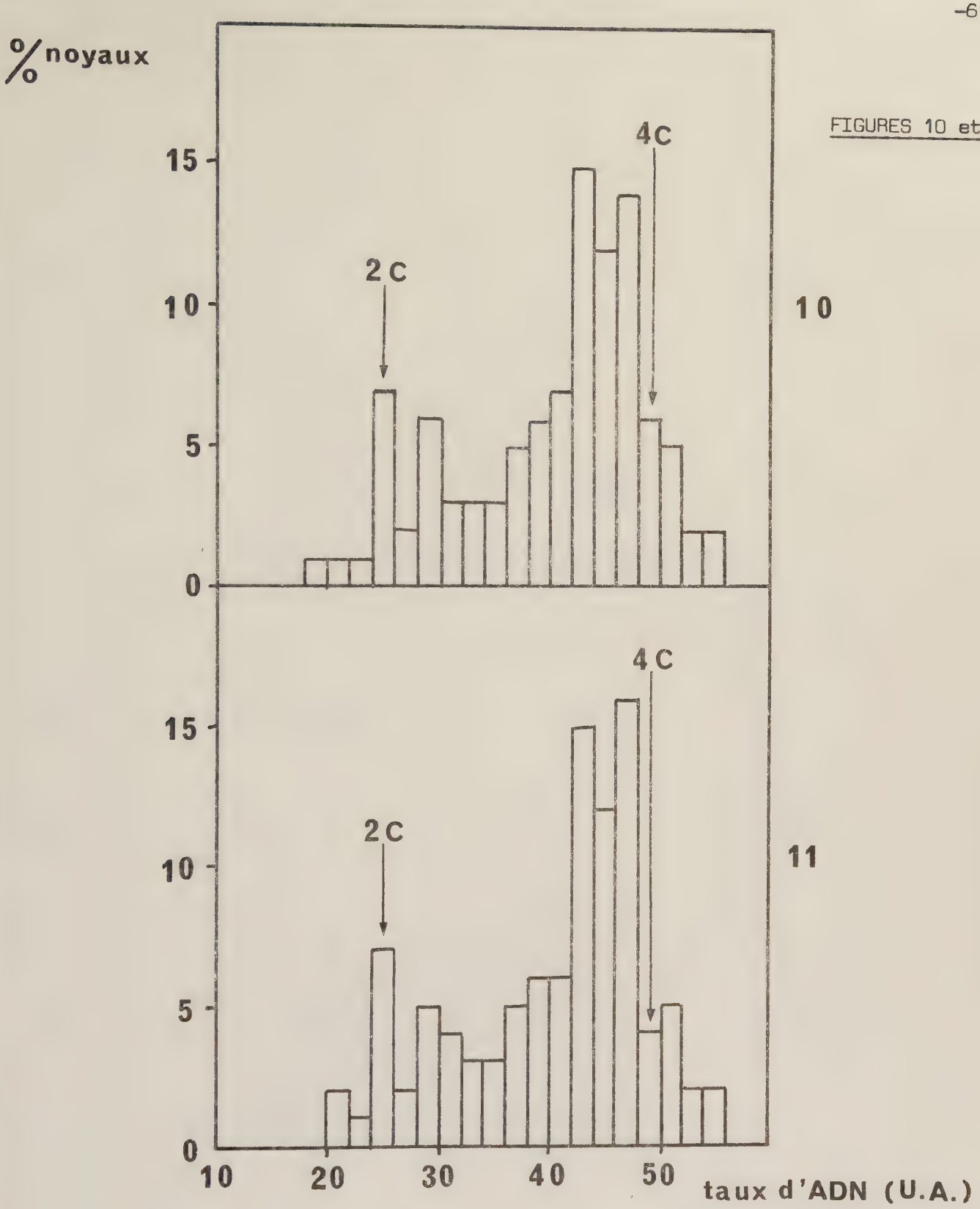
FIGURES 8 et 9



Répartition des cellules en fonction du taux d'ADN

(Méristèmes radiculaires d'Allium sativum L.)

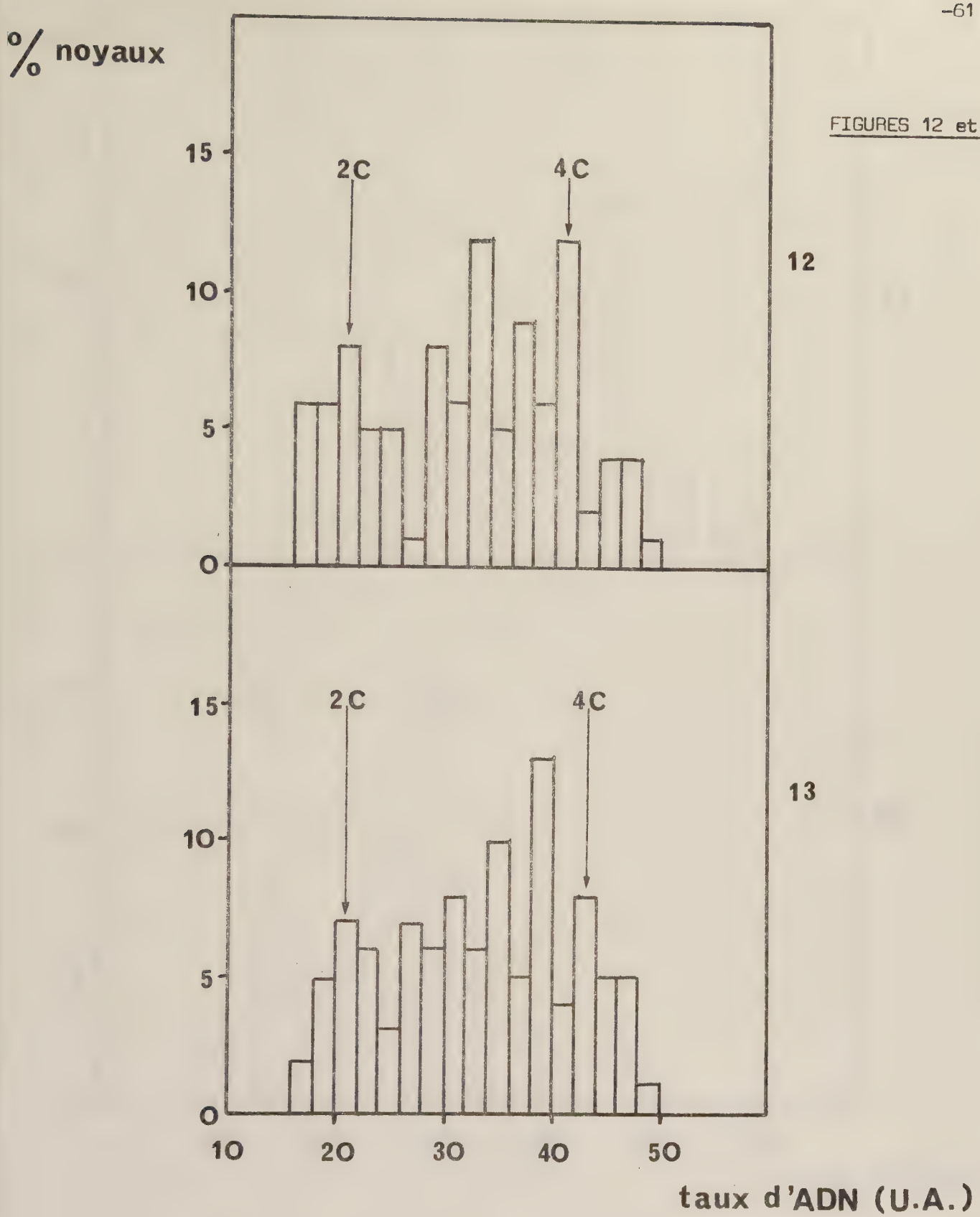
FIGURES 10 et 11



Répartition des cellules en fonction du taux d'ADN

(Méristèmes radiculaires d'Allium sativum L.)

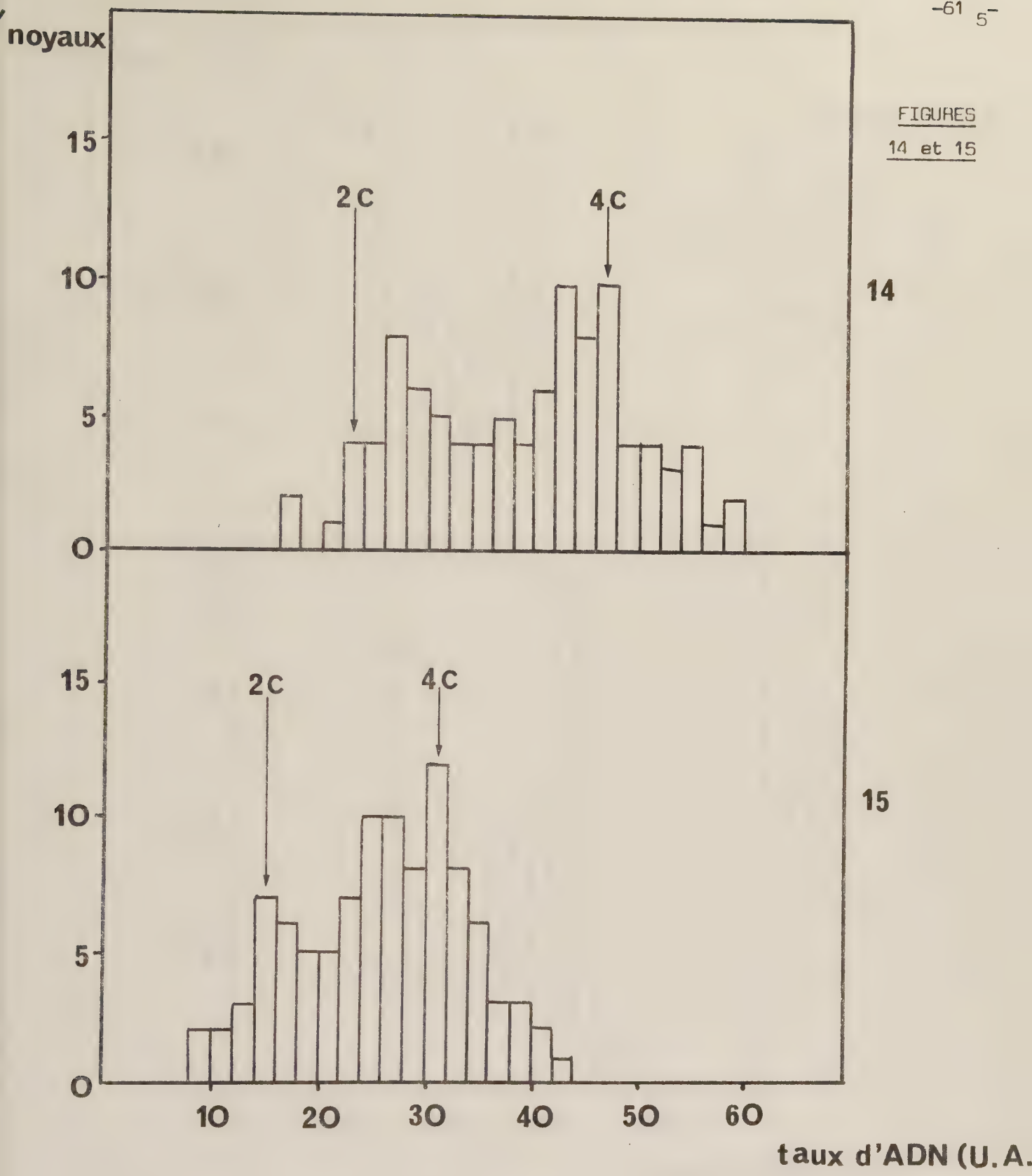
FIGURES 12 et 13



Répartition des cellules en fonction du taux d'ADN

(Méristèmes radiculaires d'Allium sativum L.)

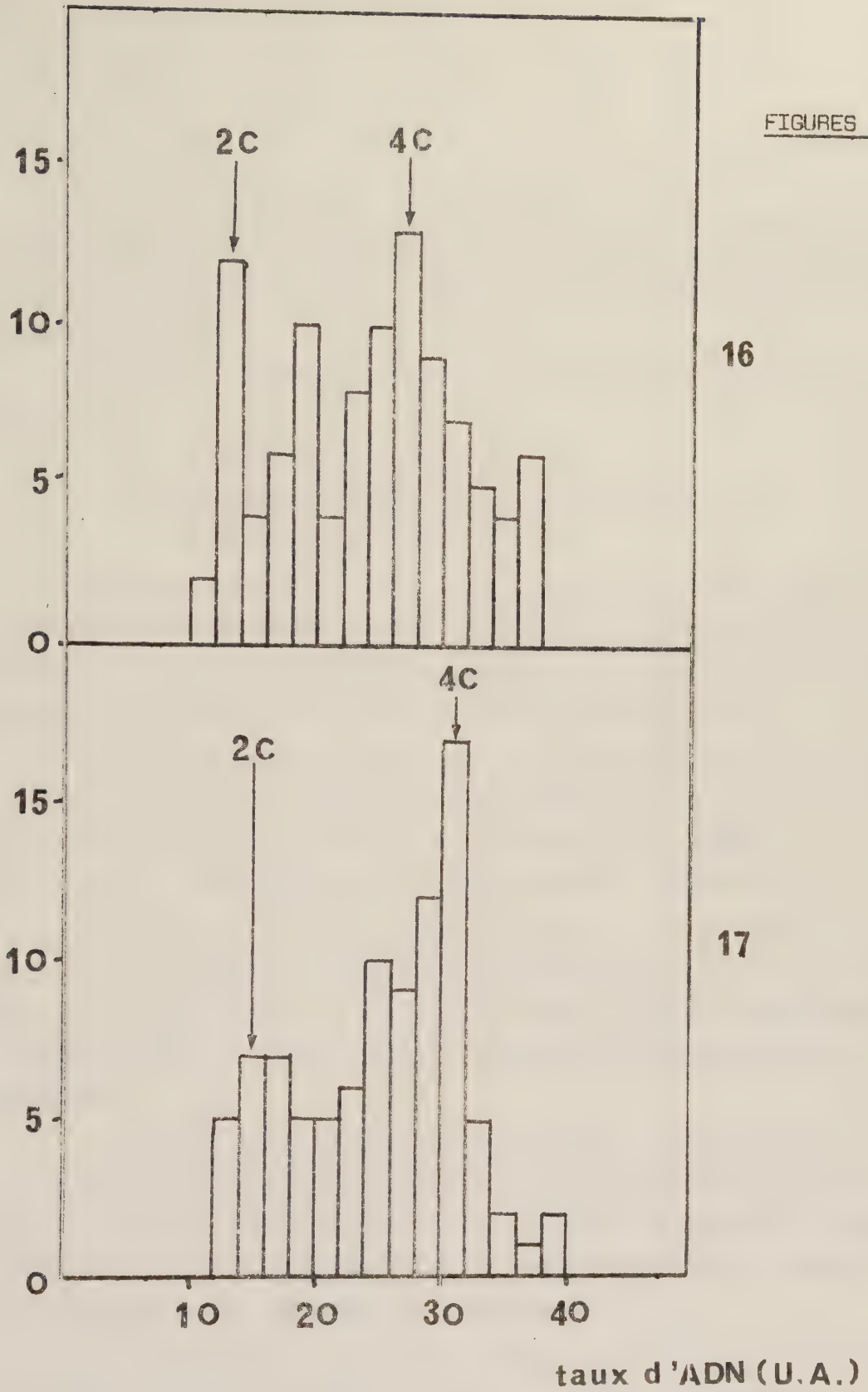
FIGURES
14 et 15



Répartition des cellules en fonction du taux d'ADN

(Méristèmes radiculaires d'Allium sativum L.)

FIGURES 16 et 17



Répartition des cellules en fonction du taux d'ADN

(Méristèmes radiculaires d'Allium sativum L.)

On remarque cependant que dans l'ensemble le groupe de cellules diploïdes est moins important que le groupe de cellules tétraploïdes, et le nombre de valeurs intermédiaires est plus élevé du côté des fortes valeurs.

Pour les comparer, il est pratique de les partager en trois parties :

- l'ensemble des valeurs 2 C
- l'ensemble des valeurs intermédiaires
- l'ensemble des valeurs 4 C

Ce partage se fait suivant la position des différents pics, et permet d'obtenir pour chaque histogramme le pourcentage de cellules ayant 2 n chromosomes, le pourcentage de cellules ayant 4 n chromosomes, et le pourcentage des cellules intermédiaires.

On pourrait penser qu'il serait ainsi possible de connaître à un instant donné les proportions de cellules en G1, S et G2, et de calculer la durée respective de chacune de ces phases.
Mais cela n'est pas possible, et pour plusieurs raisons :

- D'une part, si nous tenons compte de nos précédents résultats, il n'y a dans nos conditions expérimentales que 60 à 65 % de cellules qui parcourent le cycle. Les autres cellules possèdent aussi un stock d' ADN, et, quel que soit leur stock il désiquilibre la répartition.

- D'autre part, l'ensemble des valeurs 2 C ainsi que l'ensemble des valeurs 4 C sont réparties chacune suivant une " courbe en cloche", chaque valeur intermédiaire également : en effet, la population de chacune de ces classes est dispersée; une autre cause est dûe à la précision de la méthode, de l'ordre de 10 %.

Ces différentes courbes se chevauchent, et le partage exact des cellules entre les phases G1, S et G2 est impossible.

Cette séparation en trois lots présente cependant un intérêt car il permet de comparer la répartition des cellules d'un histogramme à l'autre, et il sera particulièrement utile dans une étude pharmacologique.

Le tableau 5 montre la répartition des cellules des histogrammes précédents suivant les valeurs 2 C, 4C, et les valeurs intermédiaires :

Les valeurs obtenues sont très comparables :

18 à 25 % pour les valeurs 2 C
33 à 42 % pour les valeurs intermédiaires
38 à 53 % pour les valeurs 4 C

Nous pouvons cependant faire une remarque : il est préférable d'essayer d'obtenir le maximum d'intensité de la coloration, car dans le cas d'une faible intensité l'histogramme est moins étalé, et la séparation en trois classes est beaucoup moins distincte.

Histogrammes des figures	pourcentages de cellules		
	2 C	intermédiaires	4 C
8	33 (I8 à 30 UA.)	36 (30 à 42 U.A.)	4T (42 à 54 U.A.)
9	20 (I4 à 22 U.A.)	38 (22 à 34 U.A.)	39 (34 à 54 U.A.)
10	I8 (20 à 30 U.A.)	42 (30 à 44 U.A.)	40 (44 à 58 U.A.)
11	I7 (20 à 30 U.A.)	42 (30 à 44 U.A.)	41 (44 à 60 U.A.)
12	25 (I6 à 24 U.A.)	37 (24 à 36 U.A.)	38 (36 à 54 U.A.)
13	20 (I6 à 24 U.A.)	40 (24 à 36 U.A.)	40 (36 à 54 U.A.)
14	20 (I6 à 28 U.A.)	34 (28 à 42 U.A.)	46 (42 à 56 U.A.)
15	I4 (I0 à I6 U.A.)	33 (I6 à 26 U.A.)	53 (26 à 40 U.A.)
16	I8 (I0 à I6 U.A.)	38 (I6 à 26 U.A.)	44 (26 à 38 U.A.)
17	I2 (I0 à I6 U.A.)	37 (I6 à 26 U.A.)	51 (26 à 40 U.A.)

C O N C L U S I O N

La comparaison de ces différentes déterminations nous a permis d'éprouver nos méthodes et notre matériel.

Nous pouvons conclure que dans l'ensemble ces méthodes donnent des résultats reproductibles d'une part, et en accord entre eux d'autre part.

Notre matériel nous semble satisfaisant.

Il ne faut cependant pas demander trop de précision à ces méthodes, et, dans une étude pharmacologique, il faudra être prudent dans l'interprétation des résultats présentant seulement de petites différences avec le témoin.

T R O I S I E M E P A R T I E

ETUDE DE L'ACTION SUR LA CINETIQUE DES CELLULES MERISTEMATIQUES DE RACINES D' ALLIUM SATIVUM L. DE TROIS INHIBITEURS PREPROPHASIQUES : L' ANTIPYRINE , L'HYDRAZIDE MALEIQUE ET LE BARBITAL

I N T R O D U C T I O N

Nous avons choisi d'étudier par nos techniques l'action provoquée par trois composés : l'antipyrine, l'hydrazide maleïque, et le barbital.

Ces trois composés ont déjà été associés au cours d'études par le test Allium car ils présentent un mode d'action comparable (31) : ils inhibent tous les trois l'entrée des cellules en mitose.

Cependant, l'hydrazide maleïque a un mode d'action un peu différent de celui des deux autres : le nombre de mitoses diminue progressivement jusqu'à leur disparition totale sans modification des proportions des divers stades.

Par contre, le barbital et l'antipyrine provoquent une inhibition de l'entrée en cinèse en même temps que le retour à l'état interphasique de la plupart des prophases bloquées.

Nous avons pensé qu'il serait intéressant de comparer leur action par les méthodes de cinétique cellulaire, et que cette étude nous permettrait de tirer des conclusions sur l'intérêt de nos méthodes dans une étude pharmacologique.

Nous avons suivi le même plan d'étude pour chacun de ces trois composés :

En premier lieu, nous avons déterminé les paramètres du cycle cellulaire par la méthode des mitoses marquées, et cela après deux sortes de traitement : traitement direct et traitement retour.

Le traitement direct consiste à réaliser le marquage en laissant les racines en contact avec le composé à étudier, et à remettre les racines après les lavages dans la solution du composé, sa concentration ne variant pas pendant toute la durée de l'expérience.

Au cours d'une étude en traitement retour, les racines sont marquées avant ou après le traitement dans un milieu privé du composé antimitotique, puis sont remises dans une solution neuve de demi-Knop.

L'étude des modifications en traitement retour est nécessaire pour compléter la première, car le traitement direct possède l'inconvénient que l'on ne peut étudier l'action d'un composé qu'avec des doses assez faibles qui ne bloquent pas complètement l'entrée en mitose.

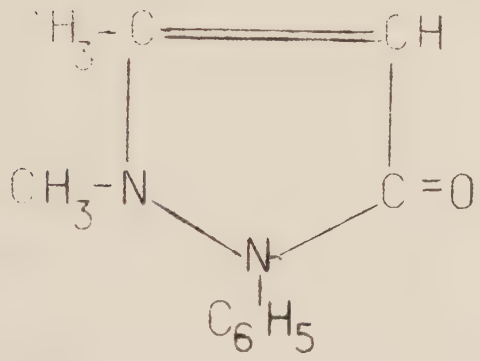
Une étude en traitement retour ne possède pas cet inconvénient mais il est possible que la mise en retour provoque certaines modifications indirectes du cycle.

C H A P I T R E I

ETUDE DE L'ACTION DE L'ANTIPYRINE

A - INTRODUCTION

L'antipyrine est la I phényl 2,3 diméthyl isopyrazolone:



DEYSSON (2) a effectué une étude détaillée de l'action de l'antipyrine sur les mitoses de méristèmes radiculaires d' Allium cepa L.

Cet auteur a observé que l'antipyrine exerçait une action mitodépressive pure à faible concentration, tandis qu'à plus forte concentration s'ajoutait une action mitoclasique :

L'action était uniquement mitodépressive pour des concentrations allant de 0,05 à 0,50 %.

Pour 0,20 %, l'index mitotique diminuait régulièrement, la répartition des figures mitotiques étant normale.

A la concentration de 0,50 %, l'action était beaucoup plus rapide : après 5 H, le nombre des cellules en mitose était déjà réduit, les figures mitotiques étant surtout des prophases et des télophases. Après 20 H de traitement le nombre des cinèses était pratiquement nul : les figures prophasiques étaient donc retournées en arrière, en stade de repos.

Nous avons repris ces concentrations de 0,20 % et 0,50 % uniquement mitodépressives.

Nous avons tout d'abord vérifié l'action apportée à ces concentrations sur les méristèmes au moyen du " test Allium " (27).

Nous avons ensuite étudié pour ces mêmes concentrations l'action de l'antipyrine sur le cycle cellulaire, sur l'index de marquage maximal, et sur la répartition des cellules en fonction du taux d' ADN.

B - ETUDE AU MOYEN DU "TEST ALLIUM " DE L'ACTION PROVOQUEE PAR L'ANTIPYRINE AUX CONCENTRATIONS DE 0,20 % et 0,50 %

1. Effets en traitement direct

La concentration de 0,20 % provoque une diminution très importante de l'index mitotique dès le premier jour (I9,3 et 2I,8 pour 1000, contre 88,4 et 88.6 pour 1000 chez le témoin).

Puis on observe une reprise d'activité : l'index mitotique est de 41 et 42,7 pour 1000 le troisième jour (79 et 85,2 pour 1000 chez le témoin), et de 61,1 et 68,8 pour 1000 le cinquième jour (87,2 et 88,9 pour 1000 chez le témoin).

A cette concentration, la répartition des stades mitotiques n'est pas modifiée.

Pour la concentration de 0,50 %, on observe une diminution rapide de l'index mitotique : après 4 H de traitement, les figures mitotiques sont principalement des prophases et des télophases.

Après 5 H. de traitement, il y a seulement quelques rares prophases.

Les cinèses ont complètement disparu au bout de 24 H.

Il n'y a pas d'anomalies, sauf quelques rares cellules binucléées.

2.- Effets en traitement retour

Après la mise en retour à la suite d'un traitement de 4 jours à la concentration de 0,20 %, l'index mitotique reprend rapidement une valeur normale, la répartition des stades mitotiques étant normale.

La mise en retour de bulbes ayant subi un traitement de 4 H dans une solution d'antipyrine à 0,50 % provoque aussi une reprise rapide de l'index mitotique à partir de la septième heure. Après 8 H il est de 75,2 pour 1000, (87,2 et 88,4 pour 1000 chez le témoin) ; la répartition des cinèses étant normale.

C - ETUDE DES MODIFICATIONS DU CYCLE CELLULAIRE A L'AIDE DE LA METHODE DES MITOSES MARQUEES.

1. Etude en traitement direct

Pour effectuer cette étude, nous avons utilisé seulement la concentration de 0,20 %, qui provoque une mitodépression d'environ 50 %.

Nous avons réalisé deux expériences, appelées a et b

- Expérience a :

Dans cette première expérience, nous avons fait un traitement préliminaire d'une durée de 2 jours et demi avec une solution d'antipyrine à 0,20 %.

Le marquage a ensuite été effectué pendant une demi-heure à l'aide d'une solution de thymidine tritiée et d'antipyrine, la concentration en antipyrine étant toujours de 0,20 %.

Après le marquage et les lavages, les racines ont été plongées à nouveau dans une solution d'antipyrine à 0,20 %.

Nous avons établi pour chaque heure de prélèvement le pourcentage de métaphases marquées. Nos résultats expérimentaux sont reportés dans le tableau n° 6. A l'aide de ces points, nous avons tracé la courbe de la figure 18.

Résultats :

	Traité	Témoin
$t2 = G2 + P + \frac{Mét}{2}$ ...	13,4	7
S	11,3	11,9
T	24	23

Pourcentage de métaphases marquées - Différentes heures après le marquage

ANTIPYRINE 0,20 % - marquage après 2 jours et demi de traitement

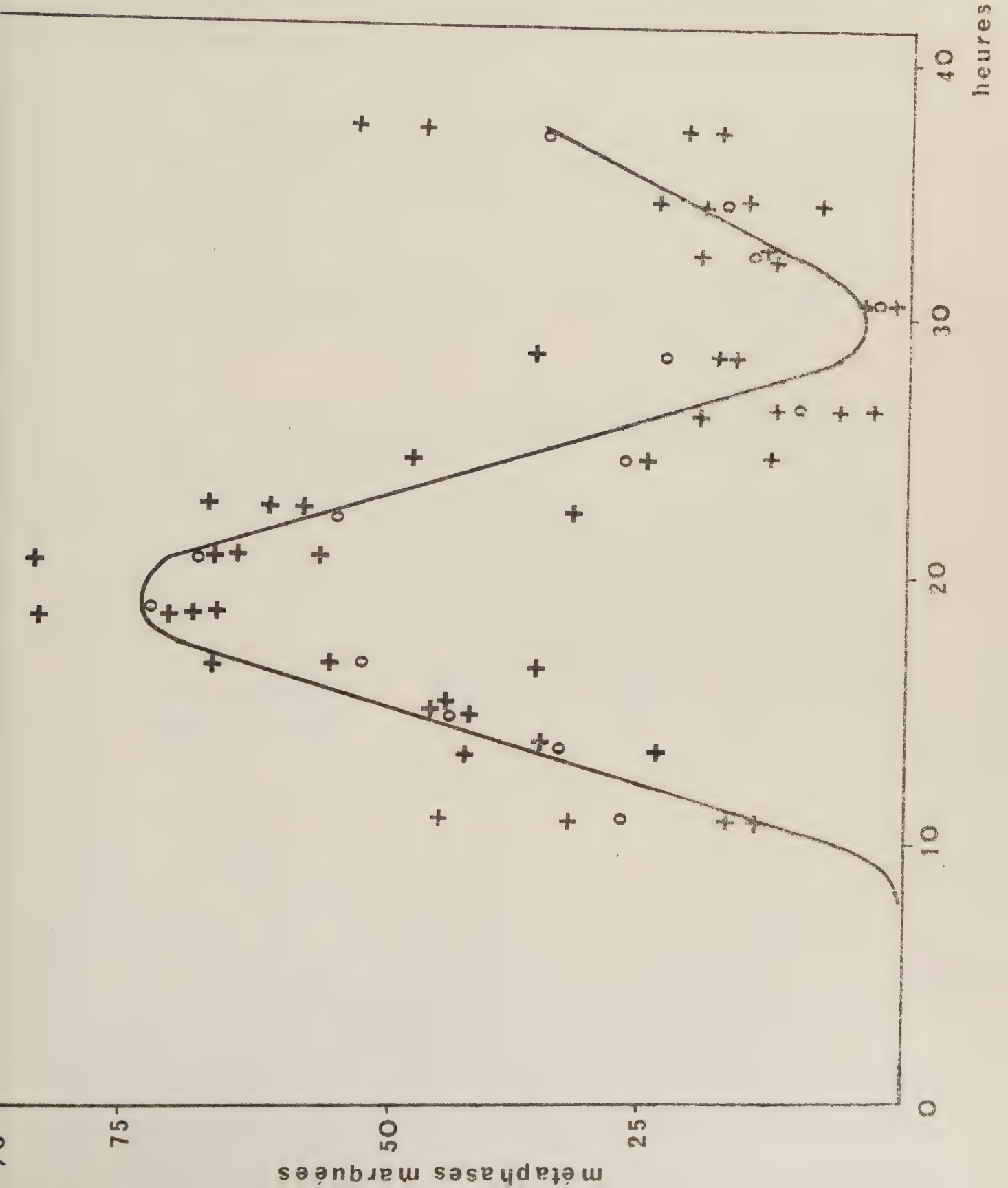
Prélèvements	Heures après le marquage													
	1CH40	I3H25	I4H40	I6H40	I8H40	20H50	22H40	24H40	26H40	28H40	30H10	33H35	34H50	37HI5
I	33,3	42	44,9	58,3	83,3	84	58,8	25	20,4	I7,6	2	20,4	I5,9	47,8
2	44,9	34,9	45	58,6	69,4	66,6	32,3	I3	3;3	I7,8	4	I4,9	24,7	53,3
3.....	I6,7	28,5	42,8	35,4	70,3	65,6	6I,7	48,4	5,7	36,5	3	I0,3	I9,7	I8,7
4	I3,8				66,2	56,5	67,3	27	I2,4		2,5		8,7	2I,8
moyenne	27;I	33,5	44,2	52,4	72,3	68,I	55	28,3	I0,4	23,9	2,8	I5,3	I7,2	35,5

tableau n° 6

Action de l'ANTIPYRINE à 0,20% en traitement continu. Evolution en fonction du temps du pourcentage des métaphases marquées après un traitement bref par la thymidine tritiée, le marquage étant effectué après 2 jours $\frac{1}{2}$ de traitement préliminaire.

Les croix représentent les valeurs déterminées dans chaque méristème.

Les cercles indiquent les moyennes correspondant à chaque traitement.



Nous pouvons remarquer que la durée de t2 du traité est pratiquement le double de celle du témoin. Les valeurs de S sont comparables. T est allongé d'une heure.

Si nous examinons la courbe, nous voyons que celle-ci a une allure régulière. Le maximum du premier pic est cependant assez faible, et il nous faudra accepter avec réserve les petits écarts entre le témoin et le traité.

Dans notre expérience témoin 2, dans laquelle le maximum atteint était du même ordre de grandeur, nous avons trouvé une durée de t2 de 9 H. Ici la valeur lue est de 13,4 H, ce qui est nettement supérieur.

Nous pouvons donc donc conclure aveccertitude à un allongement considérable de l'ensemble " $G2 + P + \frac{Mét}{2}$ ".

Par contre, nous ne pouvons pas conclure à un raccourcissement ou à un allongement des phases S et T qui sont très peu différentes de celles du témoin.

La durée de T serait peut-être un peu allongée, ce qui signifierait que l'une des phases M ou G1 du premier cycle ou S ou G2 du deuxième cycle, serait plus grande. Il serait logique de penser que t2 du deuxième cycle est aussi touché, mais plus faiblement que le premier t2. L'accoutumance observée dans l'expérience préliminaire à l'aide du "test Allium" pourrait expliquer cette différence.

Expérience b

Nous avons essayé de faire un traitement préliminaire plus long : 4 jours et demi.

Le marquage et la remise sur solution fraîche d'antipyrine ont eu lieu comme précédemment.

Les résultats ont été reportés dans le tableau n°7 . La figure 19 représente la courbe correspondant à ces points.

Résultats :

	Traité	Témoin
$t2 = G2 + P + \frac{Mét}{2}$	8	7
S	I2,5	11,9
T	27	23

D'après ce tableau, nous voyons qu'il y a un allongement général du cycle.

Examinons l'allure de la courbe :

Les mitoses marquées apparaissent assez vite, mais la montée est moins rapide que pour le témoin, ce qui peut faire penser à une variabilité de G2. Le niveau atteint est cependant élevé.

La descente est relativement lente, ce qui est dû sans doute à une variabilité de la phase S.

Les points de la deuxième montée sont assez épars.

Tout ceci montre que la population des cellules marquées n'est pas bien synchronisée, et il nous faut accepter avec réserve les différents résultats.

Pourcentage de métaphases marquées - Différentes heures après le marquage

ANTIPYRINE 0,20 % : marquage après 4 jours et demi de traitement.

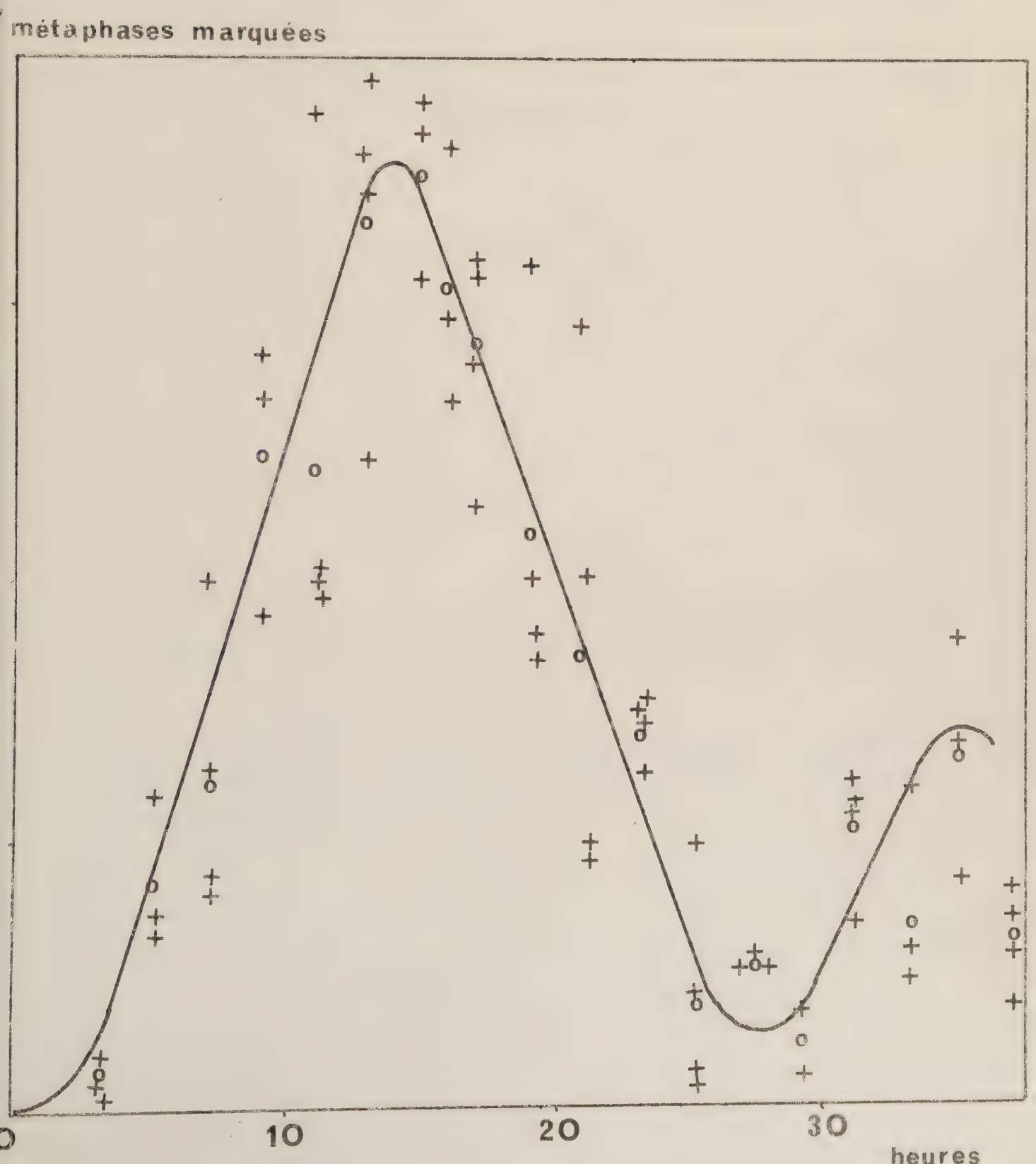
Prélèvements	Heures après le marquage																	
	3	5	7	9	II	I3	I5	I6	I7	I9	2I	23	25	27HIO	29	3I	33HIO	35	37
I	2,8	29	I9,5	65,8	48	95,4	93,3	89,6	78,3	43,5	22,6	30,7	2,2	I2,9	8,4	I6,9	II,I	32,8	8,3
2	5	I6,2	3I,2	46	48,1	85,5	90,5	73,3	69,6	49	49,I	35,3	24	I2,6	2	27,2	29	2I	I7,3
3	I,6	8,3	2I,4	70	50	88,4	76,7	65,7	55,6	4I,2	72,4	36,I	I0	I2,8		29,8	I4,3	43,5	20
4			49		92,5	60		76,4	78,I	78,4	24,4	37,I	2,3			27,4	II,6		I3,8
moyenne	3,I	2I,I	30,2	53,8	59,6	82,3	86,8	76,2	70,4	53,I	42,I	34,8	9,6	I2,7	5,2	25,3	I6,5	32,4	I4,8

Tableau n° 7

Action de l'ANTIPYRINE à 0,20% en traitement continu. Evolution en fonction du temps du pourcentage des métaphases marquées après un traitement bref à la thymidine tritiée, le marquage étant effectué après 4 jours ½ de traitement préliminaire.

Les croix représentent les valeurs déterminées dans chaque méristème.

Les cercles indiquent les moyennes correspondant à chaque prélèvement.



2. Etude en traitement retour

Nous avons réalisé cette étude pour les deux concentrations de 0,20 % et 0,50 %, correspondant respectivement aux expériences c et d .

- expérience c : concentration de 0,20 %

Nous avons effectué un traitement préliminaire de 4 jours avant de mettre en retour sur demi-knop. Le marquage a été effectué au début du retour.

Nos résultats sont reportés dans le tableau n° 8. La figure 20 représente la courbe correspondante.

Résultats

	Traité	Témoin
$t2 = G2 + P + \frac{Mét}{2}$ ..	8,2	7
S	5,7	11,9
T (à 40 %)	21	23

De ce tableau, il ressort que t2 est peut être un peu plus long chez le traité, par contre T, et surtout S, sont plus courts.

Examinons la courbe :

La première montée est extrêmement rapide, et le maximum atteint est élevé. Cela montre un bon synchronisme du départ de la population de cellules marquées.

Pourcentage de métaphases marquées - Différentes heures après le marquage
ANTIPYRINE 0,20 % : 4 jours de traitement, marquage et mise en retour

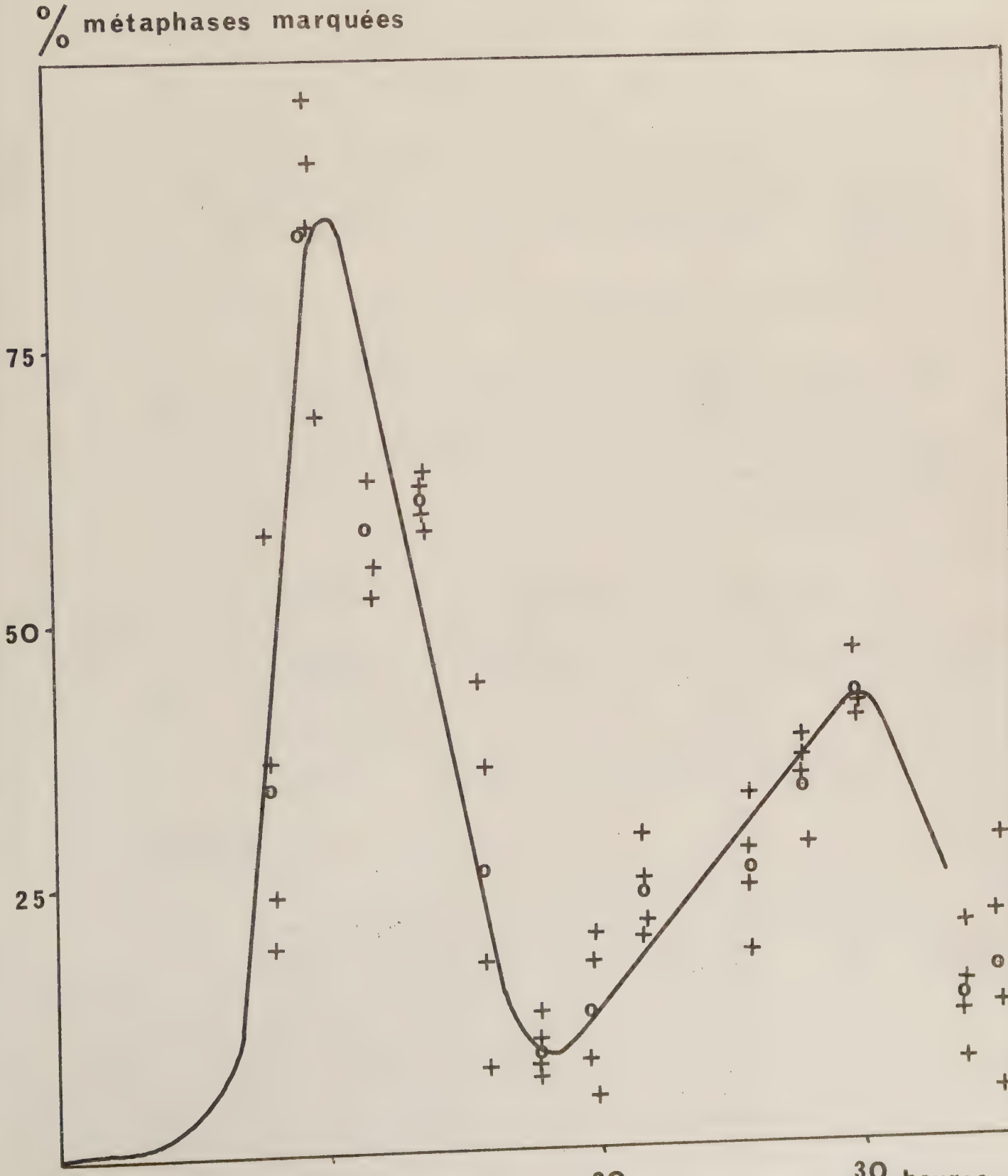
Prélèvements	Heures après le marquage												
	'8	I0	I2	I4	I6	I8	20	22	26	28	30	34	35 H I5
I	I9	68,2	62,5	6I,2	7,2	7,6	I9,9	22,7	24,I	36	45,8	I3,9	I2,8
2	24	98	54,5	59,7	35,3	I2,5	I7,3	20,8	I7,7	33,8	39,4	20	4,8
3	57,5	92,6	5I,9	64	I7,4	9,6	4,4	29	27,2	37,8	4I,3	I3,3	28
4	36,9	86,6	62,5	57,8	43,4	7,3	7,7	I9,4	32,4	27,8		7,7	2I
moyenne	34,3	86,3	57,8	60,5	25,8	9,2	I2,3	23	25,3	33,8	42,I	I3,7	I6,4

Tableau n° 8

Action de l'ANTIPYRINE à 0,20% pendant 4 jours et retour. Evolution en fonction du temps du pourcentage des métaphases marquées après un traitement bref par la thymidine tritiée effectué au moment de la mise en retour.

Les croix représentent les valeurs déterminées dans chaque méristème.

Les cercles indiquent les moyennes correspondant à chaque prélèvement.



La première descente arrive très vite, et se fait d'une façon régulière.

Nous pensons donc que nous pouvons accepter ces valeurs de t2 et de S : t2 est très légèrement allongé; par contre, S est raccourci de moitié environ.

La deuxième montée de métaphases marquées a une allure anormale : la pente est très faible, ce qui indique, un très mauvais synchronisme des cellules marquées.

Il nous semble donc difficile de tenir compte de la valeur de T : elle n'a en effet pas grande signification.

Nous aurions peut-être une meilleure approximation de la valeur de T en effectuant la mesure sur la deuxième montée au niveau correspondant à la moitié de la distance entre le minimum et le maximum, ainsi que nous l'avons expliqué dans la première partie.

Dans ces conditions, nous obtenons une valeur de 16 H.

Nous précisons que cette valeur représente M et G1 du premier cycle, et S et G2 du deuxième cycle; le deuxième S n'a pas forcément la même durée que le premier. Aussi, bien que S du premier cycle soit raccourci de 6 H par rapport au témoin, ceci ne nous permet pas de conclure que le raccourcissement du cycle provient de cette phase.

- Expérience d : concentration de 0,50 %

Le marquage a été effectué en début du retour après un traitement préliminaire de 4 H.

Les résultats sont reportés dans le tableau n°9.

La figure 21 représente la courbe correspondante :

Résultats :

	Traité	Témoin
$t2 = G2 + P + \frac{Mét}{2}$	8,8	7
S	10,5	11,9
T	15,8	23

Pourcentage de métaphases marquées - Différentes heures après le marquage

ANTIPYRINE 0,50 % : 4 H de traitement, marquage et mise en retour

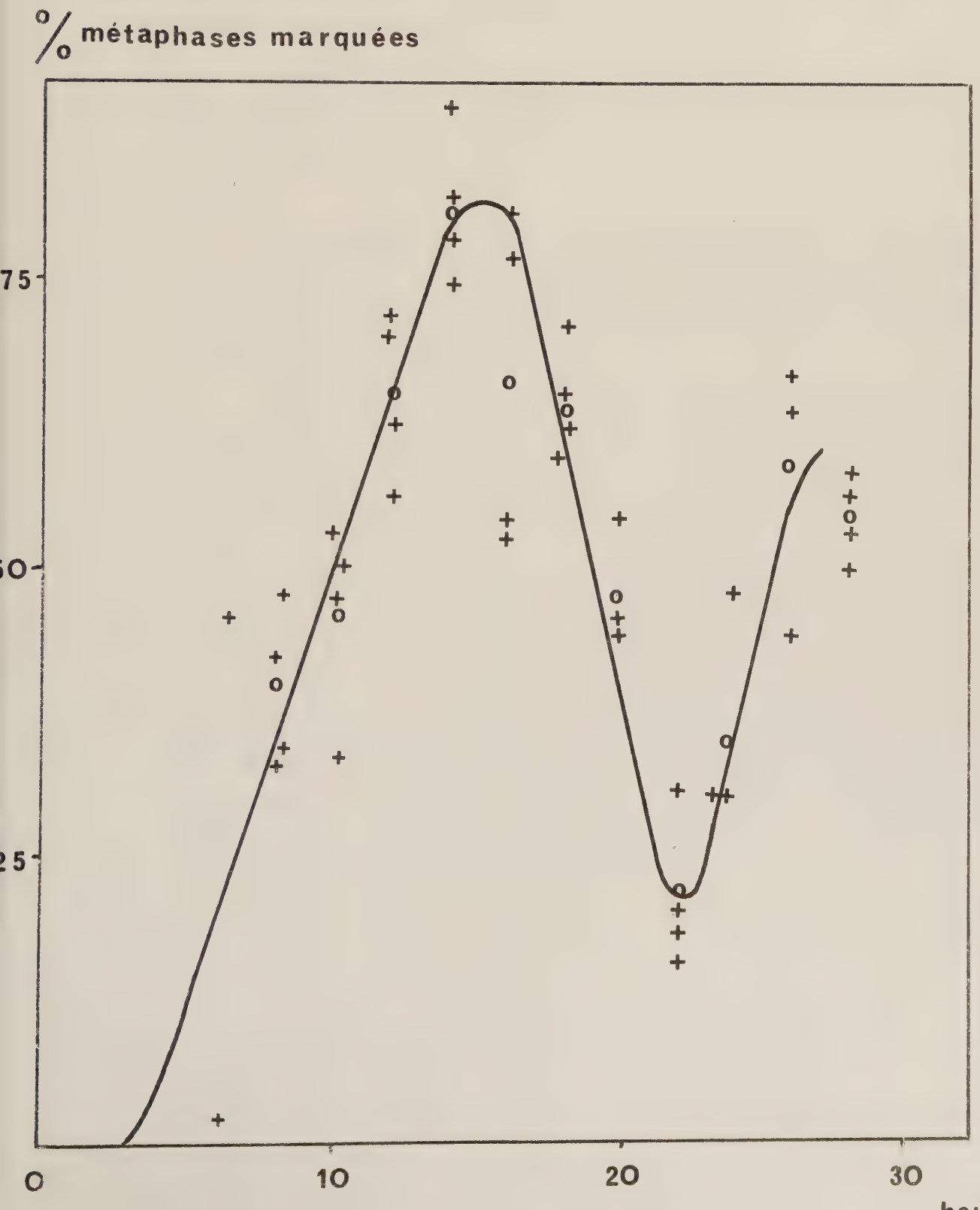
Prélèvements	Heures après le marquage											
	6	8	I0	I2	I4	I6	I8	20	22	24	26	28
I	2	47,9	50	7I,8	90,9	8I,2	62,5	54	30,3	47,3	44,I	52,9
2	45,4	33,3	53	62,3	74,6	52,8	59,5	44,2	20	29,8	63,8	56,6
3	0	42,5	46,6	7I	78,7	53,2	64,7	45,2	I7,4	29,6	66,6	57,4
4		34	33,8	56,4	82,2	77,3	7I,I		I4,5	29,5	58	50
moyenne		39,4	45,8	65,3	8I,6	66,I	64,4	47,8	20,5	34	58,I	54,2

Tableau n° 9

Action de l'ANTIPYRINE à 0,50% pendant 4h et retour. Evolution en fonction du temps du pourcentage des métaphases marquées après un traitement bref par la thymidine tritiée effectué au moment de la mise en retour.

Les croix représentent les valeurs déterminées dans chaque méristème.

Les cercles indiquent les moyennes correspondant à chaque prélèvement.



Nous voyons dans une première comparaison avec les valeurs trouvées chez le témoin que T est beaucoup plus court dans le matériel traité. S est aussi un peu raccourci; par contre t2 dure 2 H de plus, ce qui n'est pas négligeable.

D'après l'allure de la courbe, nous voyons que la population des cellules marquées est assez bien synchronisée ; la première montée est en effet assez rapide, et le niveau maximal atteint est élevé. Ceci nous permet d'accepter la valeur de t2, qui est donc plus grande que celle du témoin.

La première descente a une allure régulière. Ceci nous permet d'accepter aussi la valeur lue pour S : la durée de la phase S du premier cycle est donc légèrement plus courte que celle du témoin.

La deuxième montée des métaphases marquées se fait très tôt. La pente est cependant sensiblement la même que celle de la première montée, et nous pensons que nous pouvons utiliser la valeur de T de 16 H. donnée par la courbe.

Cependant, nous faisons bien remarquer que cette durée représente en réalité la durée de la mitose et de G1 du premier cycle, plus la durée des phases S et G2 du deuxième cycle, si l'on prend la phase S comme point de départ du cycle.

Dans ces conditions, il n'est pas possible de calculer la durée de G1. De plus, on ne peut déterminer à quel niveau se réalise le processus responsable du raccourcissement du cycle.

Nous avons remarqué cependant que, dans les premières heures après le marquage, il n'y a aucune figure métaphasique. Puis, des métaphases non marquées apparaissent à peu près en même temps que les premières métaphases marquées : ceci laisse penser qu'un blocage a pu se produire au début de la phase G2. Il est rapidement levé lors de " la mise en retour ".

3. Discussion -

Les résultats obtenus dans ces expériences nous ont montré que l'antipyrine était un agent mitodépresseur agissant au niveau de t2 en allongeant sa durée.

t2 comprend la phase G2, mais aussi la prophase et une partie de la métaphase, et l'allongement de t2 peut être dû à l'une ou l'autre de ces phases.

Les expériences menées par DEYSSON (28) faisaient penser à une action au niveau de la prophase. Il serait donc logique de penser à un allongement de la prophase.

Nous avons vu d'autre part dans l'expérience d qu'à plus forte concentration il semblait se produire un blocage en début de G2. La phase G2 serait donc également touchée.

Pour vérifier ces deux hypothèses, nous avons établi dans le cas de l'expérience a où t2 était le plus touché le pourcentage de prophases marquées (tableau n° 10 et figure 22).

Au niveau de 50 % du maximum, nous pouvons lire la durée de " G2 + $\frac{P}{2}$ ", ainsi que la durée de " G2 + P + $\frac{Mét}{2}$ " sur la courbe des métaphases marquées.

Reprenons la formule établie dans la première partie d'après la méthode de MATAGNE (page 32) :

$$M = \frac{2\,(B - A)}{x + y}$$

Dans notre cas, $B - A = 2,2$

$x = 0,52$

$y = 0,14$

La durée de la mitose est de 6,6 H

Nous avions trouvé 3,5 H dans le cas du témoin. La mitose a donc une durée beaucoup plus longue chez le traité.

La durée de la prophase est de 3,4 H (I,7 H chez le témoin), elle est aussi allongée.

Pourcentage de prophases marquées - Différentes heures après le marquage

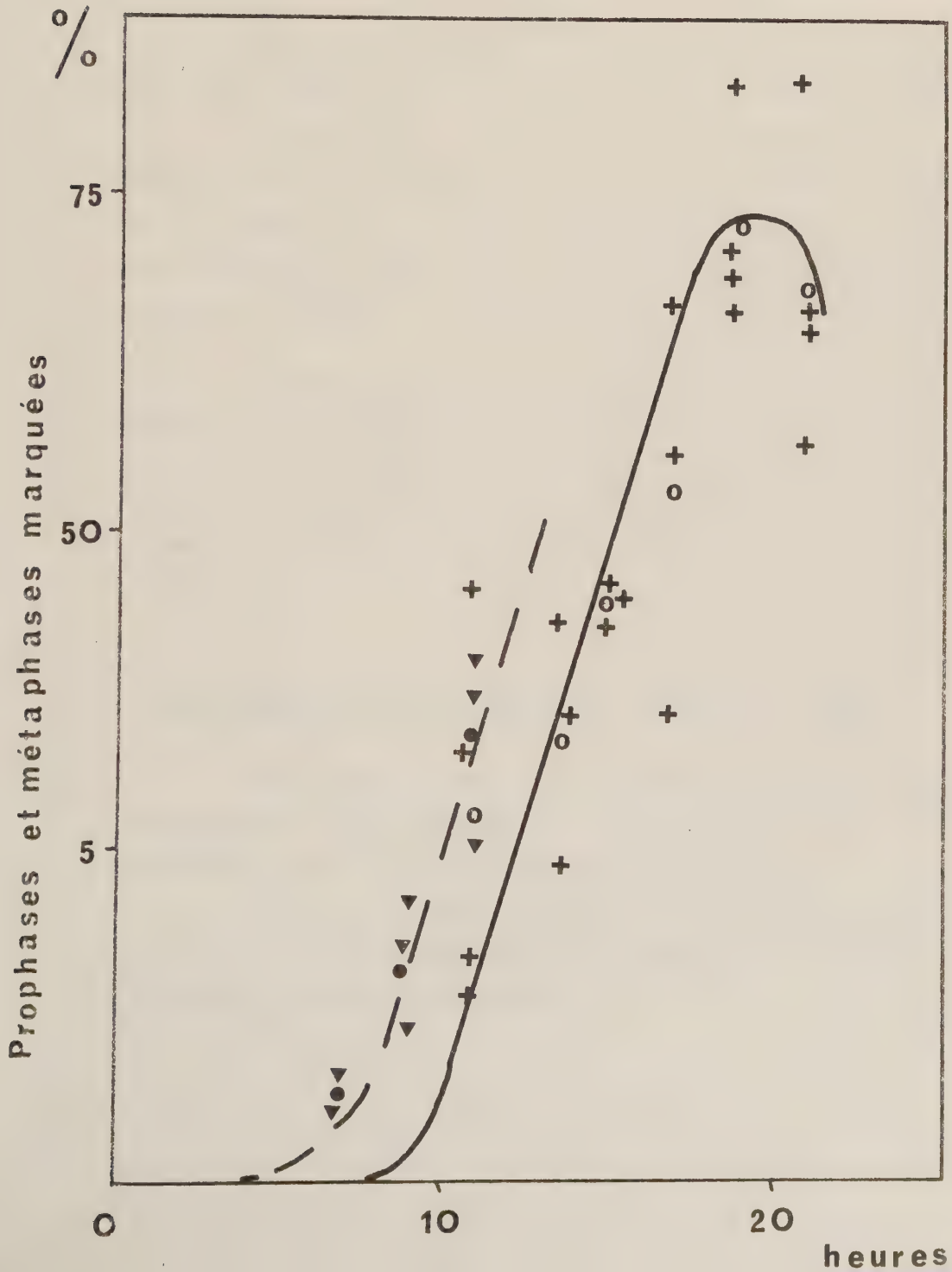
ANTIPYRINE 0,50 % : 4 H de traitement, marquage et mise en retour

Prélèvements	Heures après le marquage		
	6 H 40	8 H 40	IO H 40
I	7,I	I6,6	36,4
2	6	II	39
3		20,8	25,I
moyenne	6,5	I6,I	33,5

tableau n° IO

Action de l'ANTIPYRINE à 0,20% en traitement continu. Evolution en fonction du temps des pourcentages de prophases (trait discontinu) et de métaphases (trait continu) marquées après un traitement bref par la thymidine tritiée, le marquage étant effectué après 2 jours $\frac{1}{2}$ de traitement préliminaire.

Les triangles (prophases) et les croix (métaphases) représentent les valeurs déterminées dans chaque méristème. Les points (prophases) et les cercles (métaphases) indiquent les moyennes correspondant à chaque prélèvement.



Ainsi que nous l'avons mentionné précédemment, la répartition des stades mitotiques était normale à la concentration de 0,20 %.

L'allongement de la durée de la mitose n'est donc pas seulement dû à la prophase. Les autres stades sont aussi allongés, et il y aurait un ralentissement général de la mitose.

La durée de G2 est donnée par la différence :

$$G2 = t2 - P - \frac{Mét}{2}$$

$$G2 = 9,6 \text{ H}$$

Dans le cas témoin, G2 était égal à 5 H. La phase G2 est donc aussi augmentée, et ceci dans une proportion importante.

En conclusion, cette étude des modifications du cycle cellulaire montre que l'antipyrine à faible concentration agit au niveau de G2 d'une part, et d'autre part au niveau de la mitose. A plus forte concentration, il se produit, en plus de l'action sur les prophases observée par DEYSSON, un blocage en début de la phase G2.

D'autre part, l'action sur la phase S que nous avons observée dans les deux expériences menées en traitement retour n'a pas été retrouvée dans les expériences menées en traitement direct. Il est donc possible que cette action soit dûe à la mise en retour, et nous ne pouvons pas la retenir comme étant dûe directement à l'antipyrine.

D - DETERMINATION DE L'INDEX DE MARQUAGE MAXIMAL

Nous avons réalisé un marquage continu de 24 H en présence d'antipyrine à la concentration de 0,50 %, après un traitement préliminaire de 24 H à cette même concentration.

L'index de marquage maximal était de 30 % pour les méristèmes des racines traitées par l'antipyrine, et de 60 % pour les méristèmes des racines témoins.

Par contre, le nombre de grains par noyau était plus élevé dans les racines traitées (50), que dans les racines témoins (10).

Ces résultats indiquent que 30% seulement des cellules ont traversé la phase S au cours du deuxième jour de traitement par l'antipyrine.

D'autre part, l'apport normal de thymidine endogène nécessaire à la synthèse de l' ADN a été empêché, ce qui a entraîné une incorporation plus intense de la thymidine exogène marquée.

E. ETUDE DES VARIATIONS DE LA REPARTITION DES CELLULES EN FONCTION DU TAUX D' ADN

Cette étude a été réalisée après un traitement préliminaire de 24 heures avec une solution d'antipyrine à la concentration de 0,50 g /100 ml.

Les histogrammes correspondant au traité et au témoin sont représentés sur la figure 23.

Nous voyons que chez le traité les cellules sont réparties en deux lots séparés et inégaux, le lot le plus important correspondant aux classes de cellules ayant une teneur élevée en ADN.

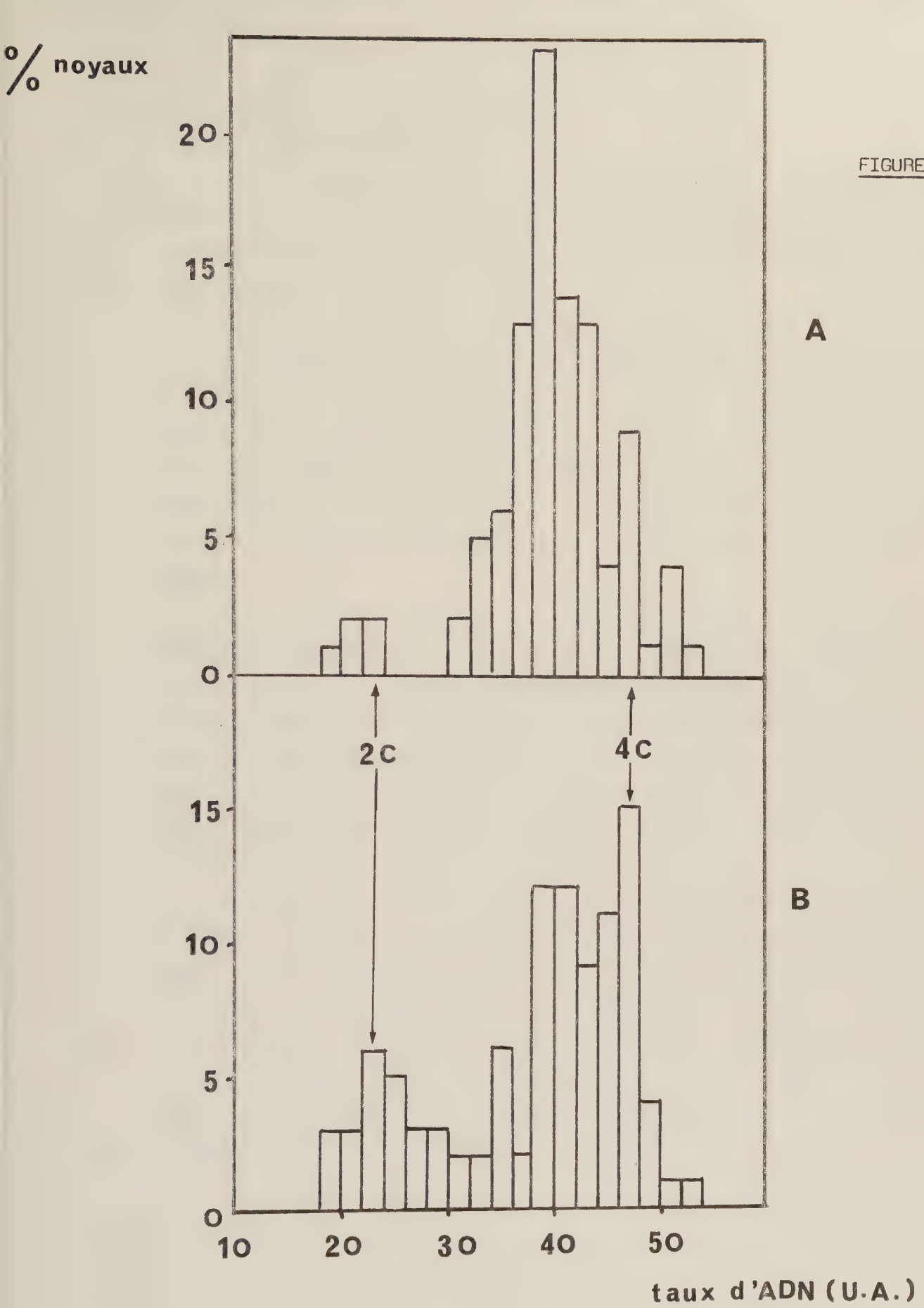
Si nous divisons les histogrammes en trois parties, suivant la teneur en ADN, nous obtenons les pourcentages suivants :

	pourcentage de cellules		
	2 C	intermédiaires	4 C
Témoin	23	36	41
Traité	5	63	32

Ce tableau met immédiatement en évidence une forte augmentation du pourcentage de cellules à valeur intermédiaire, et, si l'on observe l'histogramme, on voit que ces cellules sont accumulées au niveau des valeurs intermédiaires les plus élevées.

On peut en conclure que l'antipyrine a bloqué une partie des cellules à la fin de S, l'autre partie se trouvant en G2.

FIGURE 23



Répartition des cellules en fonction du taux d'ADN

A : ANTIPYRINE 0,50% - Traitement : 24h

B : TEMOIN

F. DISCUSSION et CONCLUSION

Nous avons trouvé successivement, suivant les conditions expérimentales, que l'antipyrine allonge les phases G2 et M, ou qu'elle bloque le cycle cellulaire, partiellement en fin de S et partiellement en cours de G2.

La concentration de 0,20 % exerce, nous l'avons vu, une mitodépression modérée. Les mitoses dont le cycle n'est pas bloqué présentent un allongement de G2 et M. En ce qui concerne l'allongement de la durée de la mitose, les résultats obtenus ici permettent de conclure qu'il porte principalement sur la prophase, mais aussi sur les autres stades, et les résultats fournis par les numérations de mitoses (28) font penser à un allongement de la télophase.

Il est vraisemblable que la mitodépression résulte également de l'interruption du cycle chez une partie des cellules, et que les modalités de cette interruption sont identiques à celles que nous avons mises en évidence avec la concentration de 0,50 %, mais la méthode du marquage bref ne nous renseigne pas sur une action de ce type lorsqu'elle ne concerne qu'une partie des cellules : les cellules bloquées avant d'arriver en mitose ne sont en effet pas prises en considération.

Pour la concentration de 0,50 %, nous pouvons conclure que l'effet mitostatique exercé ici résulte d'un blocage du cycle d'une part en G2, et d'autre part en S,; dans ce dernier cas, le blocage résulte d'un approvisionnement insuffisant en bases endogènes, et notamment en thymidine, ce qui entraîne une augmentation de l'intensité du marquage par la thymidine tritiée, alors que les dosages cytophotométriques de l' ADN révèlent que, chez ces cellules, la duplication de l' ADN n'a pas été achevée.

C H A P I T R E II

ETUDE DE L'ACTION DE L' HYDRAZIDE MALEIQUE

A. INTRODUCTION

L'hydrazide maleïque est la 1,2 - dihydro 3,6 - pyrïdazine dione :

Ce composé est connu depuis longtemps déjà pour l'effet inhibiteur qu'il exerce sur la croissance des végétaux (90,49).

Dès 1951, DEYSSON et ROLLEN (34) étudiaient son mode d'action sur les mitoses d' Allium cepa. Ils mirent en évidence une inhibition préprophasique sans action sur la mitose en cours. DEYSSON et coll. (31) essayèrent d'atténuer cette action mitodépressive par un apport d'uracile, mais les résultats furent négatifs.

Récemment LOBOV (64) a montré que l'action principale de l'hydrazide maleïque consistait en une inhibition de la biosynthèse d'ADN, et il suppose que ce composé agit en inhibant l' ADN polymérase.

DEYSSON et ROLLEN (34) ont étudié son action à plusieurs concentrations :

A la concentration de 5.10^{-4}, ils assistaient à une diminution régulière de l'activité mitotique, sans modification des proportions des figures mitotiques, avec une disparition totale des cinèses après 78 H.

La plus faible concentration étudiée était de 10^{-4}, et elle provoquait une mitodépression totale après 77 heures.

Ils n'observèrent jamais de reprise définitive de l'activité mitotique après une mise en retour.

Pour réaliser l'étude du cycle cellulaire en traitement direct, ces concentrations ne convenaient pas, la mitodépression étant trop forte. Aussi nous avons dans un premier temps réalisé une étude par le " test Allium " pour déterminer une concentration efficace plus faible.

D'autre part, l'étude du cycle en traitement retour n'est pas possible si l'activité mitotique ne reprend pas après la mise en retour.

B. ETUDE AU MOYEN DU "TEST Allium " DE L'ACTION PROVOQUEE PAR L'HYDRAZIDE MALEIQUE

1. Effets en traitement direct pour des concentrations inférieures à 10^{-4}.

La concentration 10^{-4} correspond à 0,1 g /l, c'est-à-dire 0,01 g pour 100 ml.

Nous avons étudié à l'aide du " test Allium" l'action de 5 concentrations plus faibles : 0,005 %, 0,001 %, 0,0005 % , 0,0003 %, et 0,0001 %.

a. Action provoquée par la concentration de 0,005 %

L'allongement des racines n'est pas modifié au bout de 24 H, mais les mitoses sont déjà rares. Nous n'avons pas prélevé plus longtemps.

b. Action provoquée par la concentration de 0,001 %

L'allongement des racines diminue dès le deuxième jour, et devient pratiquement nul le troisième jour.

Nous avons observé une mitodépression très nette après 24 H, et presque totale après 48 H.

c. Action provoquée par la concentration de 0,0005 %

L'allongement des racines diminue dès le deuxième jour. La mitodépression observée après 48 H est supérieure à 50 %.

d. Action provoquée par la concentration de 0,0003 %

L'allongement des racines est normal le deuxième jour, et diminue à partir du troisième jour.

La mitodépression est moins forte : après 24 H de traitement, l'index mitotique est de 49,6 °/oo et 44,8 °/oo contre 103,3 °/oo et 106,8 °/oo chez le témoin.

e. Action provoquée par la concentration de 0,0001 °/o

Pour cette concentration, l'allongement des racines et l'index mitotique sont restés comparables à ceux du témoin.

En fonction de ces résultats, nous avons choisi la concentration de 0,0003 % pour effectuer l'étude du cycle cellulaire en traitement direct.

2. Effets en traitement retour

Il est intéressant d'observer l'action provoquée sur le cycle par des concentrations plus fortes.

L'action de 0,01 % provoquait une mitodépression totale après 77 H de traitement chez Allium cepa (34).

Avec nos méristèmes radiculaires d'Allium sativum L les mitoses étaient rares après 24 H de traitement, et très rares après 30 H de traitement.

La mise en retour n'a pas apporté une reprise définitive de l'activité mitotique : nous avons observé une petite vague de mitoses après 10 heures de retour, les figures mitotiques disparaissant à nouveau et définitivement après 14 heures de retour.

La concentration de 0,005 % nous a donné des résultats analogues.

Dans ces conditions, l'étude du cycle cellulaire en traitement retour n'est pas possible à réaliser.

C. ETUDE DES MODIFICATIONS DU CYCLE CELLULAIRE A L'AIDE DE LA METHODE DES MITOSES MARQUEES

Le marquage a été effectué en présence d'hydrazide maleïque à la concentration de 0,0003 %, après un traitement préliminaire de 24 H.

Après les lavages, nous avons remis les racines en contact avec une solution d'hydrazide maleïque à cette même concentration.

Nos résultats expérimentaux sont reportés dans le tableau n° 11. A l'aide de ces points, nous avons tracé la courbe de la figure 24.

Résultats :

	Traité	Témoin
$t2 = G2 + P + \frac{Mét}{2}$	8	7
S	17,5	11,9
T	25,6	23

Nous voyons d'après ce tableau que la durée de la phase S est très allongée sous l'influence de l'hydrazide maleïque; par contre t2, et la durée totale du cycle T, ne sont que légèrement allongés.

EVANS et SCOTT (39) ont obtenu une action semblable sur le cycle cellulaire des méristèmes radiculaires de Vicia faba : à la concentration de 0,25 mM, l'hydrazide maleïque provoquait un allongement important de la phase S (20,5 H au lieu de 7,5 H chez le témoin), et une légère action sur la phase G2.

Examinons l'allure de la courbe :

La première montée est régulière, et la pente est élevée. Mais la pente de la première descente est plus faible, et le niveau le plus bas atteint est de 35 % le pourcentage des métaphases marquées reste élevé.

Pourcentage de métaphases marquées - Différentes heures après le marquage

HYDRAZIDE MALEIQUE 0,000I % : marquage après 24 H. de traitement

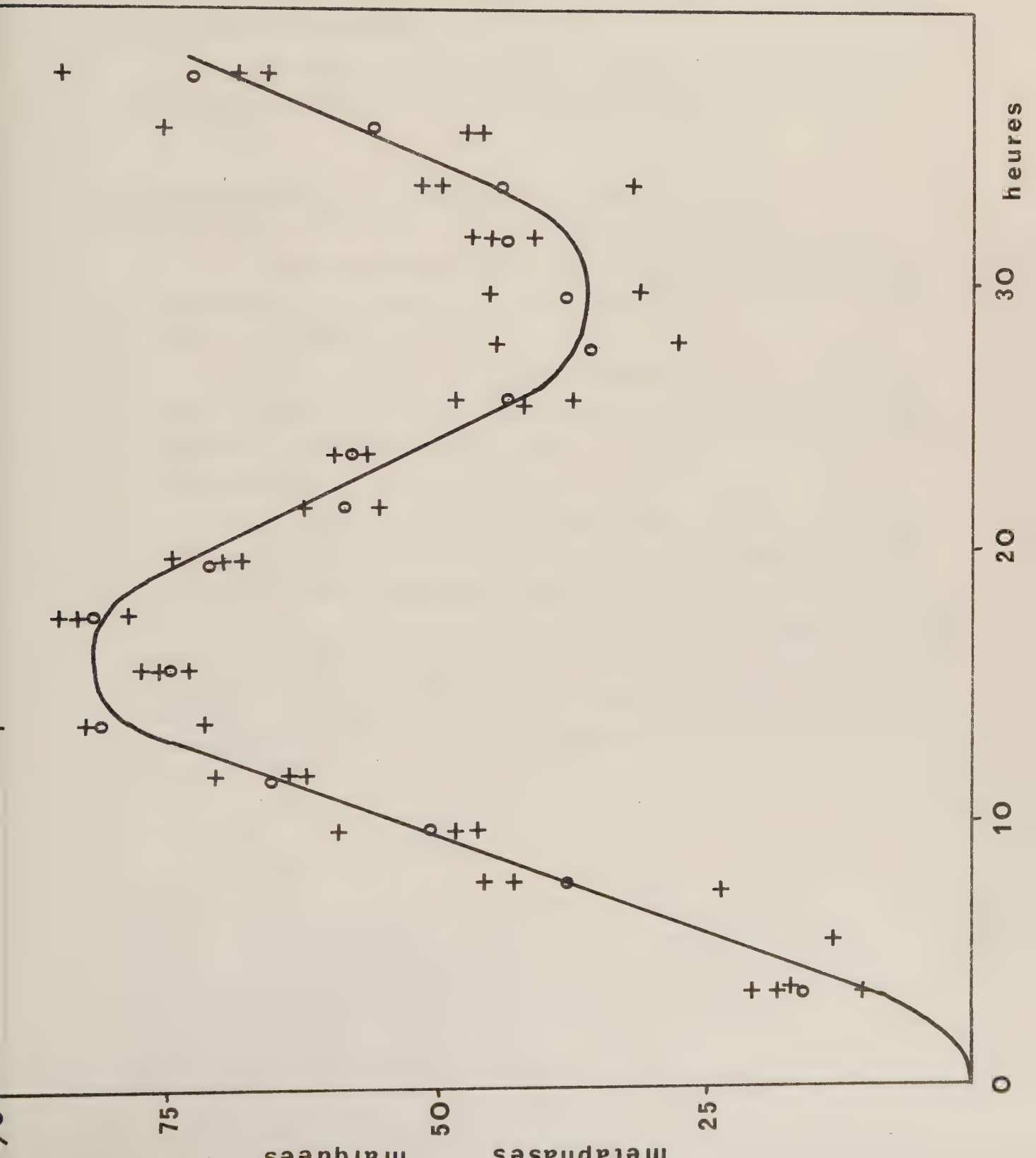
Prélèvements	Heures après le marquage																	
	2	3H30	5H30	7H30	9H30	IIH30	I3H30	I5H30	I7H30	I9H30	2IH30	23H30	25H30	27H30	29H30	3IH30	33H30	35H30	37H30
I	2,4	IO	I3	24	46,5	63,9	82,6	73,8	83,7	69,6	56,I	57,8	48,9	35,7	32	46,6	50,7	47,7	66,6
2		I7		45,9	48,6	62,9	72,2	76,5	83,3	69,7	63,I	60	42,8	27,7	45,8	42,I	32,5	47,2	65,7
3		I7,2		42,9	59,6	70,8	90,9	75,3	79	75			38,2	45,4		45,8	52,6	76,5	69,6
4		20,6																	
moyenne		I6,2		37,6	5I,5	65,8	8I,9	75,2	82	7I,4	59,5	58,9	43,3	36,2	38,9	44,8	45,2	57,I	73,9

Tableau n° II

Action de l'HYDRAZIDE MALEÏQUE à 0,0003% en traitement continu. Evolution en fonction du temps du pourcentage de métaphases marquées après un traitement bref par la thymidine tritiée.

Les croix représentent les valeurs déterminées dans chaque méristème.

Les cercles indiquent les moyennes correspondant à chaque prélèvement.



Pour expliquer cela, on peut envisager plusieurs hypothèses:

- Il peut y avoir un ralentissement des cellules qui étaient en début de S au moment du marquage, si bien que des cellules marquées " en retard " vont empêcher le pourcentage de s'abaisser normalement.

- Il peut se produire aussi un blocage ou un fort ralentissement des cellules qui étaient en G1 au moment du marquage : dans ce cas, il y a peu de métaphases non marquées, et le pourcentage des métaphases marquées reste élevé.

- On peut aussi envisager l'éventualité d'une action au niveau de la phase G2 correspondant au deuxième cycle.

D. DETERMINATION DE L'INDEX DE MARQUAGE MAXIMAL

Nous avons déterminé l'index de marquage maximal aux deux concentrations de 0,0003 % et 0,01 % après un traitement préliminaire de 24 heures.

Dans les deux cas, il est inférieur à celui du témoin (30,2 % contre 64,2 % chez le témoin pour la plus faible concentration, et 41 % contre 62,2 % chez le témoin pour la plus forte concentration).

Le nombre de grains par noyau est aussi plus faible dans les racines traitées (15 au lieu de 22 pour la concentration de 0,0003 %, et 30 au lieu de 85 pour 0,01 %).

Ces résultats indiquent que 30 à 40 % seulement des cellules ont traversé la phase S pendant les 24 H de marquage; ces cellules d'autre part ont incorporé très peu de thymidine exogène, surtout dans le cas de la concentration 0,01 %.

E. ETUDE DES VARIATIONS DE LA REPARTITION DES CELLULES EN FONCTION DU TAUX D' ADN

Nous avons réalisé cette étude aux deux concentrations utilisées pour les autres méthodes : 0,0003 % et 0,01 %.

a. Etude à la concentration 0,0003 %

Après 24 Heures de traitement, la répartition des cellules est comparable à celle du témoin, avec cependant plus de valeurs tétraploïdes, montrant une accumulation de cellules au niveau fin de la phase S ou début de la phase G2 (figure 25).

Ceci est illustré par le tableau suivant :

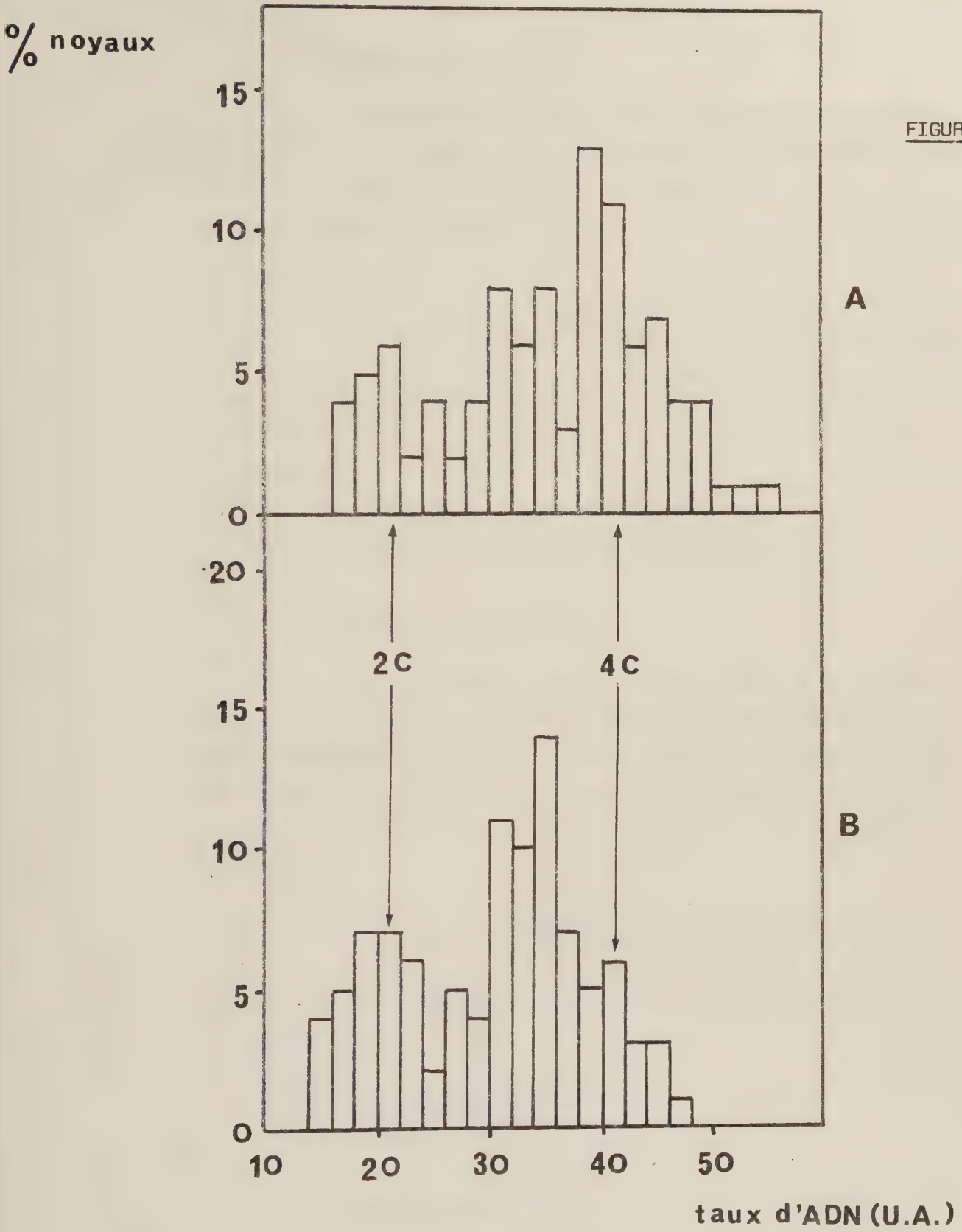
	Pourcentage de cellules		
	2 C	intermédiaires	4 C
Témoin	23	38	39
Traité	15	26	59

b. Etude à la concentration de 0,01 %

Pour cette concentration, nous avons pensé qu'il serait intéressant de réaliser une étude cinétique de la répartition des cellules suivant le taux d' ADN : en effet, l'étude par le " test Allium " nous a montré une mitodépression totale après 24 H de traitement, puis une légère reprise mitotique lors de la mise en retour entre 10 H et 14 H, reprise qui disparaît rapidement.

Nous avons dans ce but établi des histogrammes à des temps différents de traitement : 11 H, 24 H, 48 H, 30 H et 24 H de retour.

FIGURE 25



Répartition des cellules en fonction du taux d'ADN

A : HYDRAZIDE MALEÏQUE 0,0003% - Traitement : 24h

B : TEMOIN

1. Traitement de 11 H.

L'histogramme obtenu dans ce cas est comparable à l'histogramme du témoin, avec cependant une très légère augmentation des valeurs tétraploïdes (figure 26).

On peut établir le tableau suivant :

	Pourcentage de cellules		
	2 C	intermédiaires	4 C
Témoin	18	42	40
Traité	18	37	45

Ce tableau confirme l'observation précédente.

2.- Traitement de 24 H.

La répartition des cellules après 24 H de traitement est différente de celle du témoin (figure 27) : les valeurs diploïdes sont en plus grand nombre. On remarque aussi une légère accumulation des premières valeurs intermédiaires (cellules en début de S). Ceci est illustré par le tableau suivant :

	Pourcentage de cellules		
	2 C	intermédiaires	4 C
Témoin	17	42	41
Traité	48	21	31

3. Traitement de 48 H

Dans ce cas, la répartition des noyaux est comparable à la précédente (figure 28).

La différence des pourcentages de cellules de chacune des classes est aussi comparable :

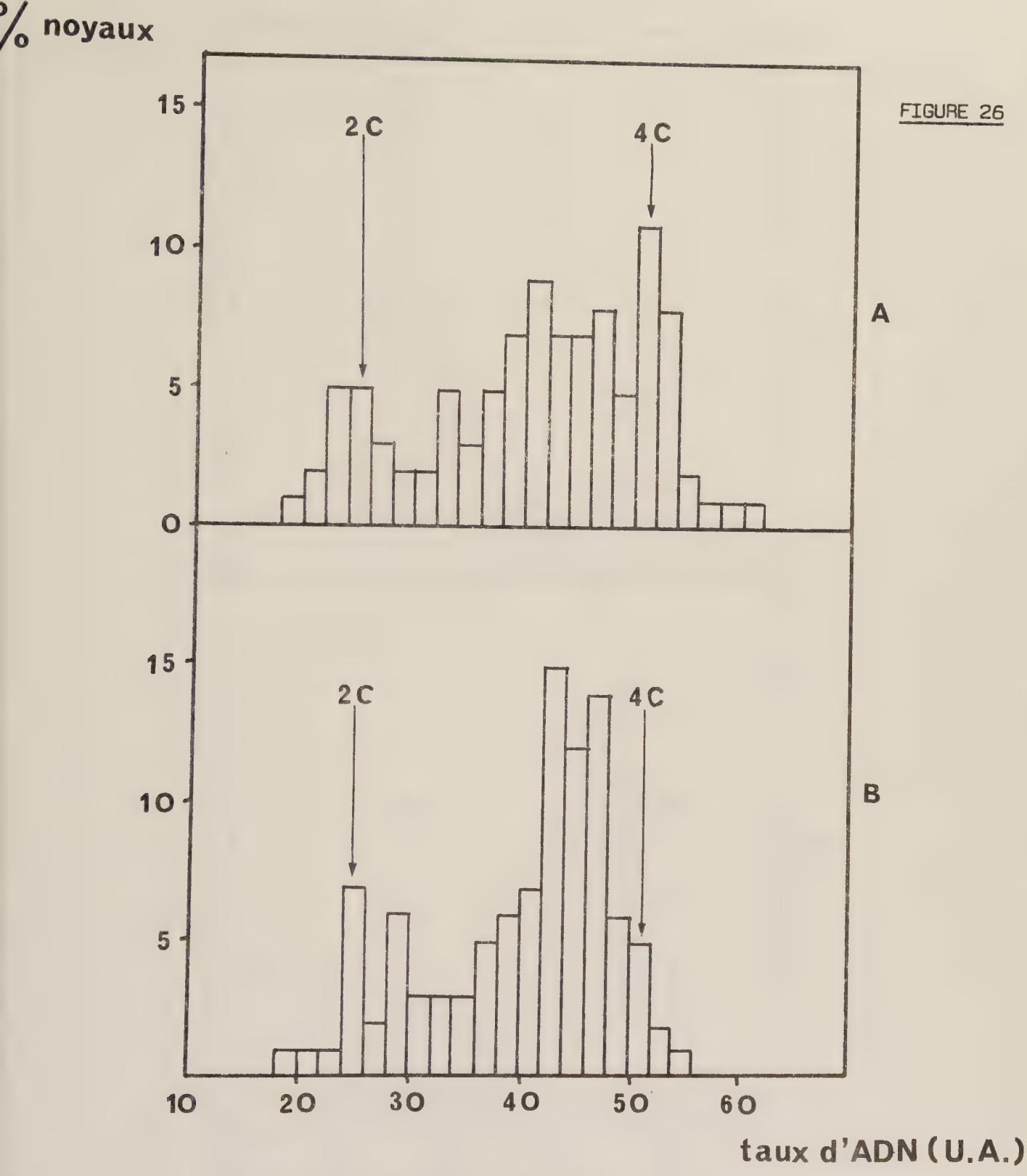


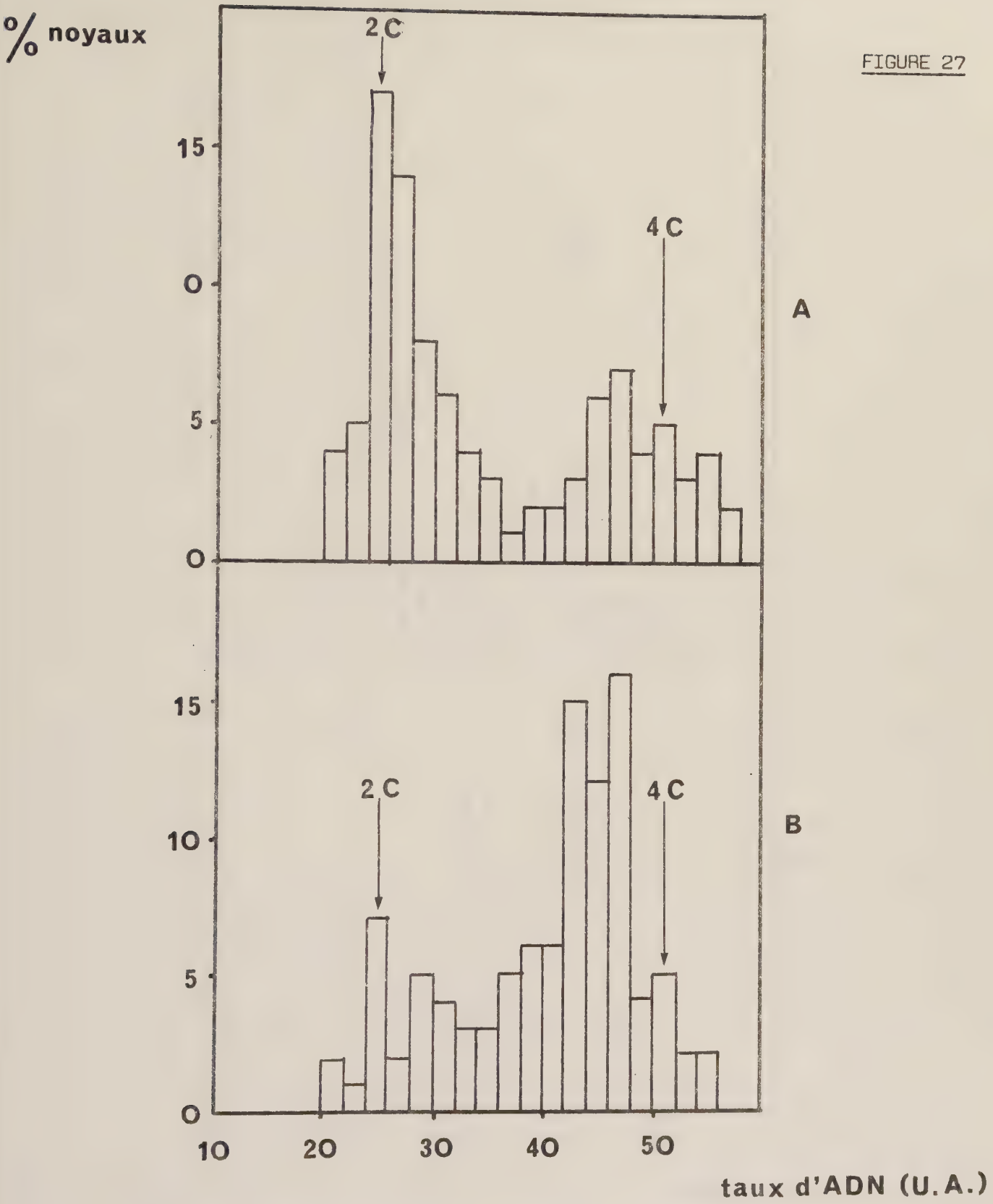
FIGURE 26

Répartition des cellules en fonction du taux d'ADN

A : HYDRAZIDE MALEÏQUE 0,01% - traitement 11 h

B : TEMOIN

FIGURE 27

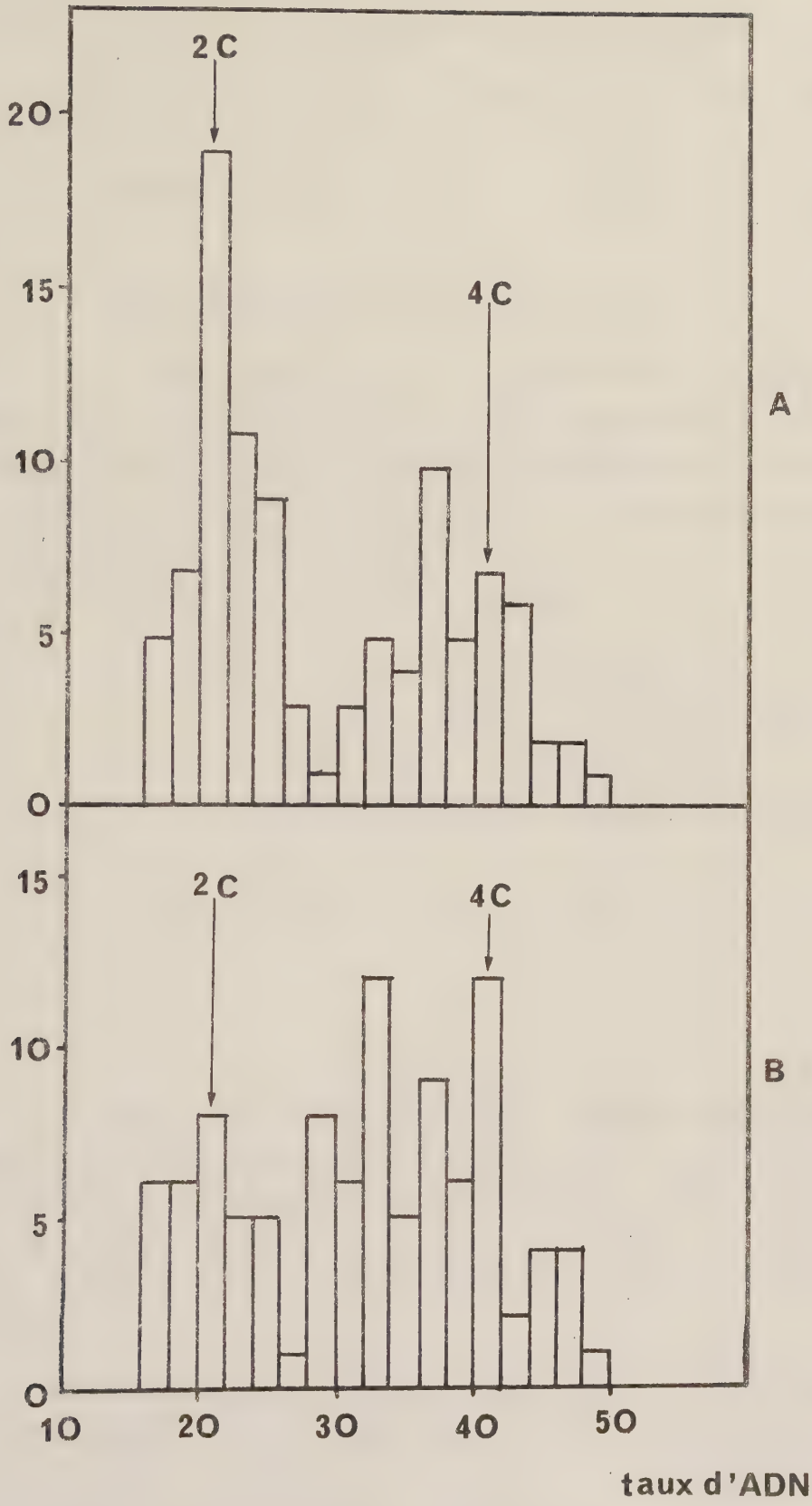


Répartition des cellules en fonction du taux d'ADN

A : HYDRAZIDE MALEÏQUE à 0,01% - traitement 24 h

B : TEMOIN

FIGURE 28



Répartition des cellules en fonction du taux d'ADN.

A : HYDRAZIDE MALEÏQUE 0,01% - traitement 48 h

B : TEMOIN

	Pourcentage de cellules		
	2 C	intermédiaires	4 C
Témoin	25	37	38
Traité	42	25	33

4. Traitement de 30 H et 24 H de retour

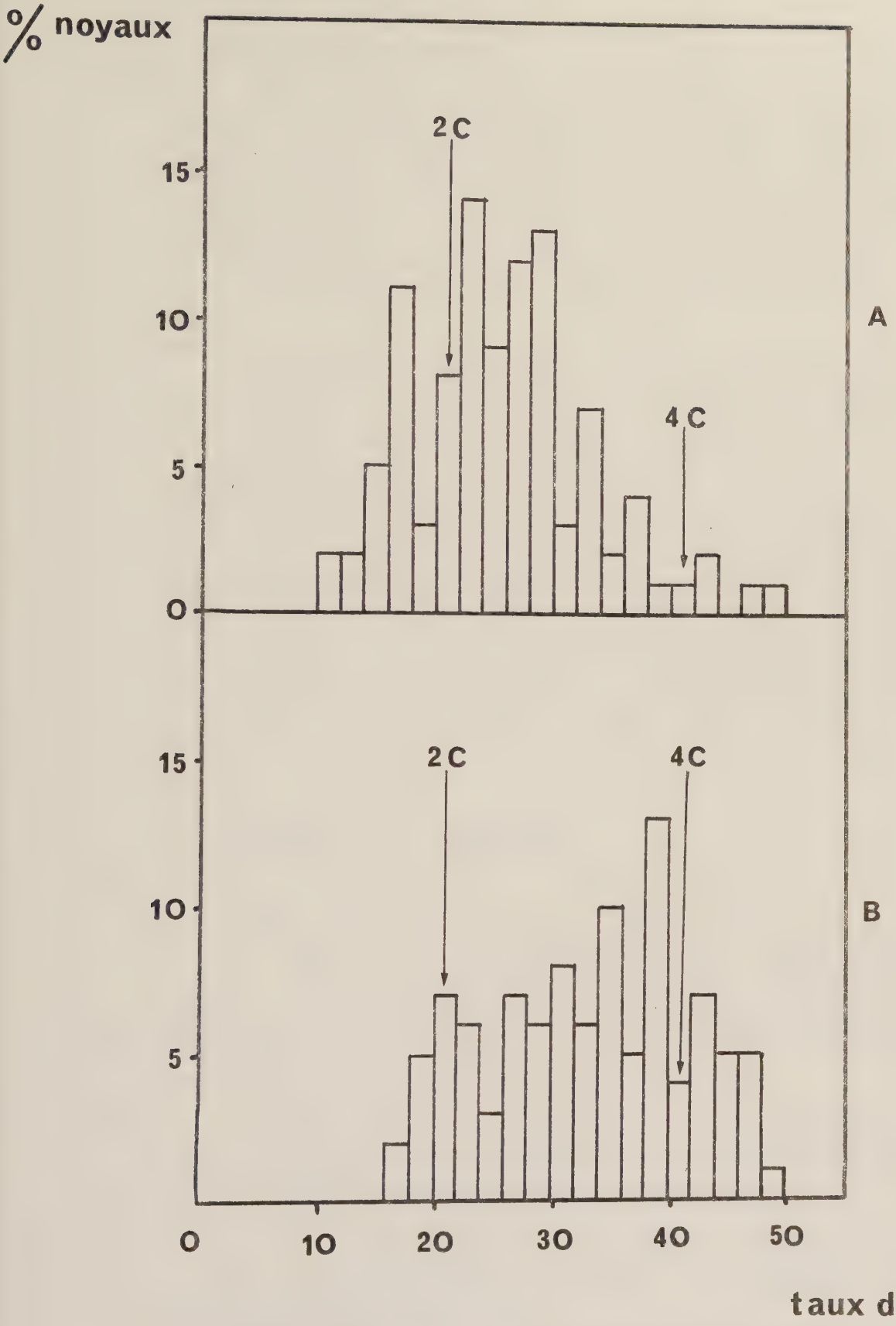
Nous remarquons que la répartition des noyaux a changé (figure 29) : il y a toujours une forte proportion de valeurs diploïdes, mais le nombre de cellules tétraploïdes a beaucoup diminué. Par contre, les valeurs intermédiaires ont augmenté, principalement les prémières (cellules en début de S).
Ceci est illustré par le tableau suivant :

	Pourcentage de cellules		
	2 C	intermédiaires	4 C
Témoin	20	40	40
Traité	45	46	10

D'après ces résultats, on peut conclure que l'hydrazide maleïque agit principalement au niveau de G 1 et au début de S . Cette action s'accompagne d'un blocage en G2 qui est levé par la mise en retour. Le retour lève aussi en partie le blocage au niveau de G1, mais les cellules sont rapidement arrêtées et s'accumulent en début de S.

Ceci est en accord avec l'étude par le " test Allium " qui nous avait montré une mitodépression suivie d'une brève reprise mitotique : ceci correspondrait à la levée du blocage en G2 , suivie d'un blocage en S lors du cycle suivant.

FIGURE 29



Répartition des cellules en fonction du taux d'ADN

A : HYDRAZIDE MALEÏQUE 0,01% : traitement 30 h et 24 h de retour.

B : TEMOIN

F. ETUDE COMPLEMENTAIRE

Pour essayer de confirmer ces derniers résultats, nous avons réalisé un marquage bref en début du retour, après 30 H de traitement dans une solution d'hydrazide maleïque à la concentration de 0,01 %. Nous avons observé une petite vague de mitoses vers 10 H de retour, et ces figures n'étaient pas marquées. Ces cellules étaient donc en G1 ou en G2 au moment du marquage, mais pas en S.

Nous avons d'autre part réalisé un marquage continu de 11 H dans une solution de thymidine tritiée et d'hydrazide maleïque à 0,01 %, puis nous avons continué le traitement par l'hydrazide maleïque jusqu'à 30 H, et mis en retour sur le liquide de Knop dilué au demi. Une petite vague de mitoses est apparue entre 10 H et 12 H de retour, et les figures mitotiques étaient toutes marquées. Ces cellules ont donc traversé la phase S pendant le marquage, et se sont accumulées en G2. La mise en retour lève ce blocage. Par contre, les cellules qui étaient en G1 à la fin du marquage (donc non marquées), n'arrivent pas en mitose et restent définitivement bloquées avant cette phase.

G. DISCUSSION ET CONCLUSION

Reprenons les divers résultats obtenus :

L'étude de la modification du cycle cellulaire sous l'influence de l'hydrazide maleïque à faible concentration met en évidence un allongement important de la phase S, accompagné d'une action sur les deux autres phases G1 et G2.

L'index de marquage maximal est inférieur à celui du témoin, quelle que soit la dose étudiée; ceci indique un blocage en une autre phase que S, c'est-à-dire G1 ou G2.

L'intensité d'incorporation est aussi plus faible : ceci laisse supposer que les cellules qui ont atteint S ne peuvent achever la synthèse d' ADN.

Le dosage cytophotométrique de l' ADN nucléaire dans le cas de la plus forte concentration permet de confirmer cette hypothèse : il montre un blocage qui semble irréversible en G1 et en début de S , et un blocage réversible au niveau de G2.

Dans le cas de la plus faible concentration, on observe seulement une petite accumulation de cellules en fin de S début de G2.

Les deux expériences complémentaires permettent de penser à la possibilité d'une part d'un blocage en G1 ou en G2, et d'autre part d'un blocage partiel réversible au niveau de G2, et irréversible au niveau de G1.

Ces résultats sont en accord entre eux, et nous pouvons conclure que l'hydrazide maleïque à faible concentration agit au niveau de la phase S et de la phase G2 principalement, avec peut-être une action sur la phase G1.

A plus forte concentration, l'hydrazide maleïque provoque un blocage des cellules en deux endroits :

- blocage au niveau de G2 (et ce blocage serait réversible lors de la mise en retour)

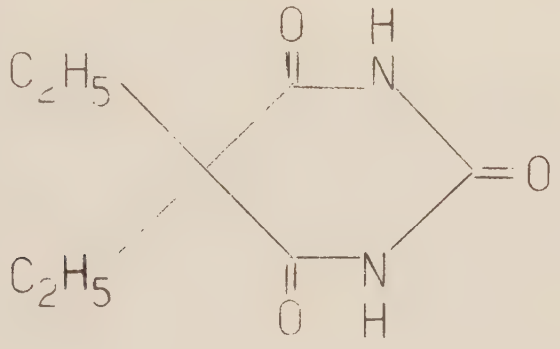
- et surtout blocage irréversible au niveau de G 1 début de S.

C H A P I T R E III

ETUDE DE L'ACTION DU BARBITAL

A - INTRODUCTION

Le barbital, (Véronal N.D.), est la diéthyl malonylurée.



OSTERGREN (78) avait signalé en 1944 que ce composé exerçait une action légèrement mitoclasique.

En 1951, DEYSSON et ROLLEN (32,33) ont étudié son mode d'action à l'aide du " test Allium "

De fortes concentrations de l'ordre de 0,75 % provoquaient une disparition totale des cinèses en 12 H accompagnée d'anomalies : ils observaient quelques stathmométaphases et quelques fragmentations chromosomiques.

Des concentrations plus faibles exerçaient seulement une action mitostatique : la concentration de 0,50 % provoquait une mitodépression totale après 24 H, les dernières figures mitotiques observées étant des prophases.

La concentration de 0,20 % exerçait une action mitodépressive très forte au cours des deux premiers jours, puis l'activité mitotique reprenait temporairement, et ces auteurs avaient envisagé l'hypothèse d'une dissociation de l'action exercée.

B. ETUDE AU MOYEN DU "TEST ALLIUM" DE L'ACTION PROVOQUEE PAR LE BARBITAL

1. Effets en traitement direct

Nous avons étudié l'action pour les trois concentrations de 0,10 %, 0,20 % et 0,50 % qui provoquaient seulement un effet mitostatique.

a. concentration de 0,10 %

L'allongement des racines diminue dans ce cas à partir du deuxième jour. On observe une légère mitodépression à partir du deuxième jour aussi : l'index mitotique est de 79 °/oo et 77,3 °/oo contre 99,3 °/oo et 108 °/oo chez le témoin.

b. concentration de 0,20 %

Sous l'action d'un traitement à cette concentration l'allongement des racines diminue dès le premier jour, et il est nul à partir du quatrième jour.

On observe une mitodépression dès le premier jour. Après 48 H d'action, l'index mitotique est de 46,7 et 49,1 °/oo contre 97,8 et 94,2 °/oo chez le témoin.

c. concentration de 0,50 %

Pour cette concentration, l'action est plus forte : l'allongement des racines est nul après 24 H de traitement, et l'examen des lames montre seulement quelques prophases en régression.

Pour étudier les modifications du cycle en traitement direct, la concentration provoquant une mitodépression proche de 50 % nous semble préférable, et nous avons retenu la concentration de 0,20 %.

2. Effets en traitement retour

Nous avons réalisé cette étude seulement pour la concentration de 0,50 %, qui provoque une rapide mitodépression totale sans anomalie mitotique, et semble convenir pour l'étude du cycle cellulaire en traitement retour.

Nous avons effectué un traitement de 24 H avant la mise en retour sur milieu nutritif : l'activité mitotique reprend après 15 H de retour, et est accompagnée d'une légère tuméfaction de l'extrémité des racines.

C. ETUDE DES MODIFICATIONS DU CYCLE CELLULAIRE A L'AIDE DE LA METHODE DES MITOSES MARQUEES

1. Etude en traitement direct

Nous avons tout d'abord réalisé cette étude pour la concentration de 0,20 %.

Après un traitement préliminaire de 24 H, les racines ont été marquées en présence d'une solution de barbital à 0,20 %.

A la suite des lavages, effectués toujours en présence de barbital, les bulbes ont été remis sur une solution neuve de barbital à cette même concentration.

Les résultats expérimentaux sont exprimés dans le tableau n°12 et la courbe de la figure 30 lui correspond.

Nous avons lu sur cette courbe les valeurs suivantes :

	Traité	Témoin
$t2 = G2 + P + \frac{Mét}{2}$	12	7
S	23,8	11,9
T		23

La durée totale du cycle ne peut être mesurée sur la courbe : ayant arrêté les prélèvements à 44 H, nous n'avons pas obtenu la deuxième " montée " qui correspond au retour en métaphase de la population des cellules marquées.

Pourcentage de métaphases marquées - Différentes heures après le marquage

BARBITAL 0,20 % : marquage après 24 H. de traitement

Prélèvements	Heures après le marquage																
	2 H	3H30	5H30	7H30	9H30	IIH30	I3H30	I5H30	I7H30	I9H30	2IH30	29H30	3IH30	33H30	35H30	37H30	43HI5
I	3,5	6,4	I0,8	I5,7	27	35,8	5I,I	60	77,7	75	64,5	75	54,I	64,7	45,6	50	9,4
2	2,8	I0,5	I2,I	I0	35	28	38,8	50	69,6	88	74	82,3		37,6	44,6	36,6	I6
3	0	7,3		5,9	38,5	40					73,I			33,5	36,3	25,I	
3																27,7	
moyenne	2,I	8	II,4	I0,5	33,5	34,6	44,9	55	73,6	8I,5	70,5	78,6		45,2	42,I	34,8	I2,7

Tableau n° I2

La première partie est en effet considérablement allongée : d'une part la durée de t2 est de 12 H au lieu de 7 H chez le témoin, mais surtout la durée de S est doublée : 23,8 H au lieu de 11,9 H chez le témoin.

Examinons l'allure de la courbe :

La pente de la première montée est plus faible que celle du témoin, mais la montée est régulière. On observe ensuite une sorte de plateau, puis une descente dont la pente est comparable à celle de la montée.

On peut remarquer aussi que les premières cellules marquées arrivent rapidement en mitose.

Ceci montre que les cellules qui étaient en fin de S au moment du marquage traversent la phase G2 avec peut être un léger ralentissement, mais que par contre les cellules en cours de S et au début de S sont fortement retardées.

L'interprétation de cette courbe ferait donc penser à une action importante au niveau de la phase S , provoquant un fort ralentissement des cellules pendant la traversée de cette phase.

A la suite de cette première étude, qui ne nous donnait que des résultats partiels, nous avons pensé que la concentration choisie était trop élevée.

Nous avons réalisé la même expérience avec une solution de barbital à la concentration de 0,10 %, qui provoque une mitodépression plus légère.

Les résultats expérimentaux obtenus sont reportés dans le tableau n° 13, et nous ont permis de tracer la courbe de la figure 31 .

Nous pouvons lire sur cette courbe les valeurs suivantes :

	Traité	Témoin
$t2 = G2 + P + \frac{Mét}{2}$ ...	10,1	7
S	12,6	11,9
T	25	23

Pourcentage de métaphases marquées - Différentes heures après le marquage

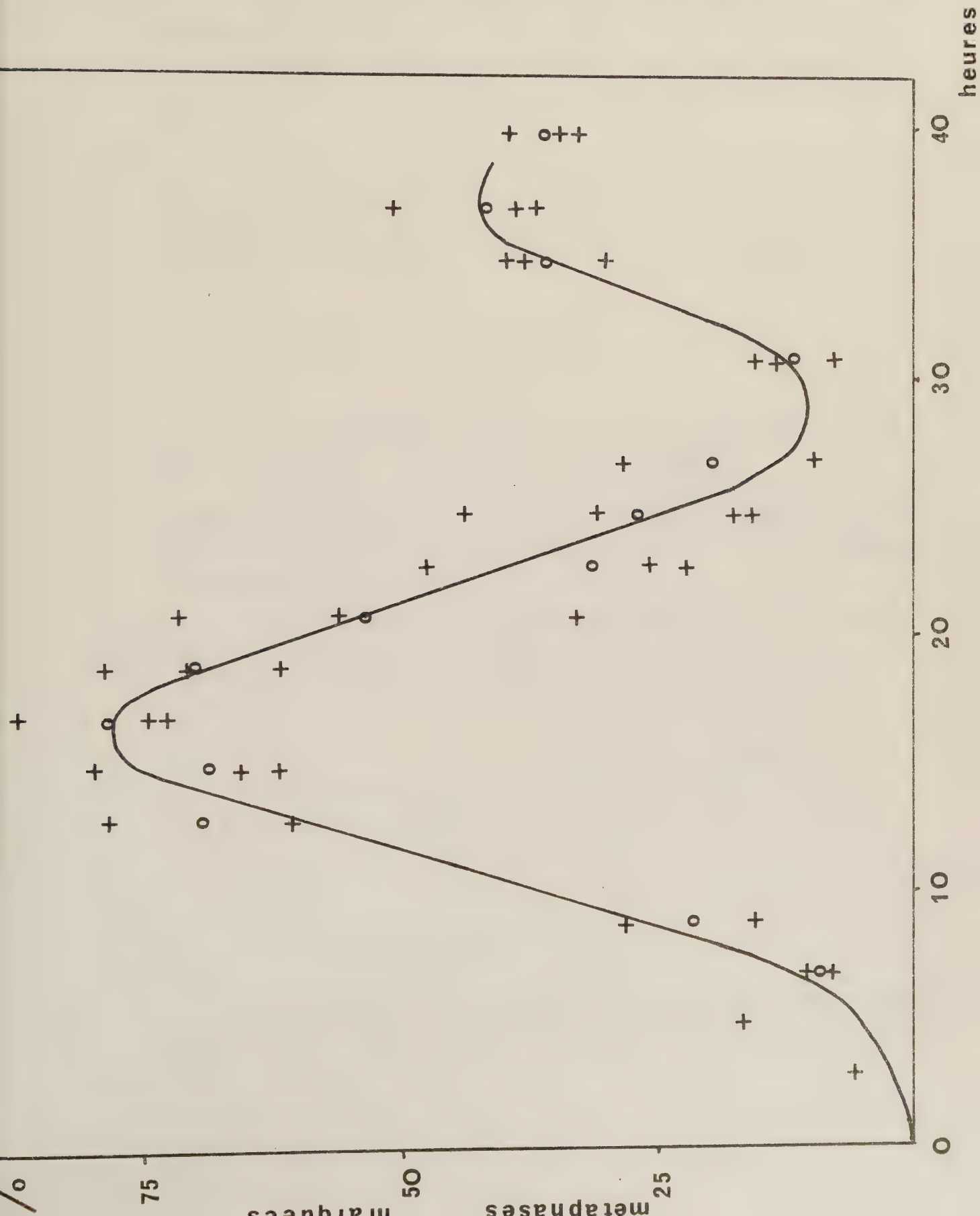
BARBITAL 0,IO % - marquage après 24 H. de traitement

Prélèvements	Heures après le marquage															
	2H50	4H50	6H50	8H50	I2H50	I4H50	I6H50	I8H50	20H50	22H50	24H50	26H50	30H50	34H50	36H50	39H50
I	5,4	I6,6	8	I5,2	78,6	80	74,I	62,2	33,3	22,I	I7,5	9,5	I5,5	38,5	37	33,I
2			IO	28,I	6I,2	62,3	87,3	7I	72,I	47,9	3I,2	23,2	I3,I	30,3	5I,I	34,6
3						65,6	74,4	79,2	56,4	25,9	44,I	2I,5	7,5	39,8	38,9	39,7
4											I6,2					
moyenne			9	2I,6	69,9	69,3	78,6	70,8	53,9	3I,9	27,2	I9,7	I2	36,2	42,3	35,8

Tableau n° I3

Action du BARBITAL à 0,10% en traitement continu. Evolution en fonction du temps du pourcentage de métaphases marquées après un traitement bref par la thymidine tritiée.

Les croix représentent les valeurs déterminées dans chaque méristème. Les cercles indiquent les moyennes correspondant à chaque prélèvement.



L' ensemble des phases est un peu allongé, principalement t2 -

Discutons ces résultats :

L'allure de la courbe est régulière, et montre une synchronisation assez correcte de la population des cellules marquées.

Il semble donc que le barbital à cette concentration ait une action peu importante sur la population de cellules observées ici.

t2 est un peu plus long, ce qui peut provenir d'un allongement de G2, mais aussi d'un léger retard des cellules en fin de S. Cependant dans ce cas, les cellules en cours de S au moment du marquage ne semblent pas ou seulement très peu retardées.

2. Etude en traitement retour

Nous avons choisi pour cette étude la concentration 0,50 % qui provoque une mitodépression totale et rapide.

Le marquage a été effectué après 24 h de traitement préliminaire dans une solution de barbital à 0,50 % - Puis nous avons lavé les racines, et nous les avons remises sur le milieu nutritif de Knop dilué au demi -

Les résultats expérimentaux sont regroupés dans le tableau n° 14, et la courbe de la figure 32 lui correspond.

Nous mesurons sur la courbe les valeurs suivantes :

	Traité	Témoin
$t2 = G2 + P + \frac{Mét}{2}$	18,4	7
S	9,4	11,4
T		23

La durée de t2 est considérablement allongée - Par contre, la durée de la phase S est un peu plus courte.

Pourcentage de métaphases marquées - Différentes heures après le marquage

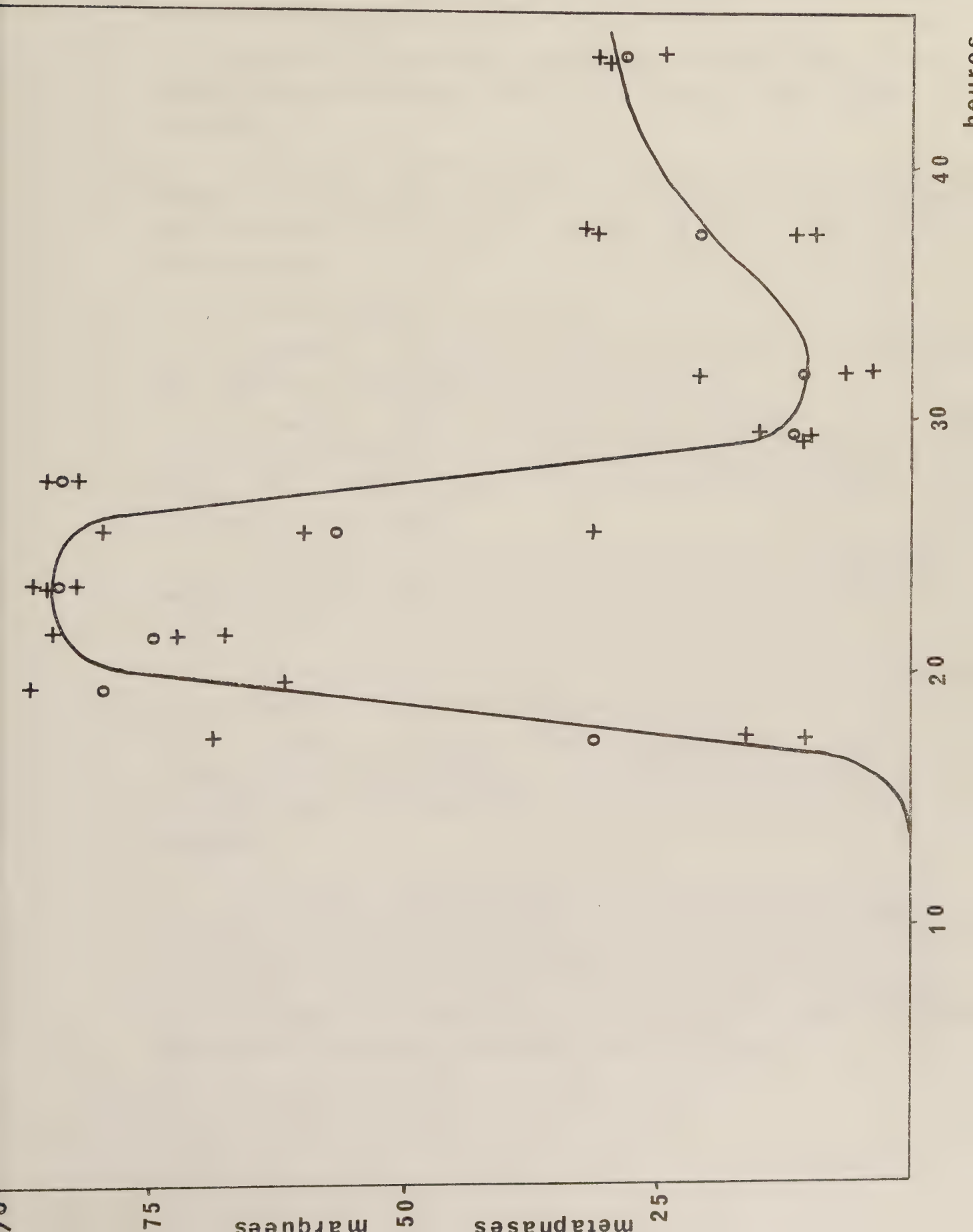
BARBITAL 0,50 % : 24 H de traitement, marquage et mise en retour

Prélèvements	Heures après le marquage									
	I7 H30	I9 H 30	2I H 30	23H30	25 H30	27 H30	29 H30	3I H55	37 H30	44 H 30
I	IO,6	9I,3	84,6	82,7	80	83,4	I4,8	[illegible],8	32,5	29,7
2	69,2	62,I	68	84,7	60,7	84,7	IO,5	2I	IO	25,2
3	I6,4	87	72,6	86,6	3I,8	84,5	IO,6	4,2	II,8	3I,9
4									3I,8	
moyenne	32	80,I	75	84,4	57,5	84,2	II,9	IO,6	2I,5	28,9

tableau n° I4

Action du BARBITAL à 0,50% pendant 24h et retour. Evolution en fonction du temps du pourcentage de métaphases marquées après un traitement bref par la thymidine tritiée effectué au moment de la mise en retour.

Les croix représentent les valeurs déterminées dans chaque méristème.
Les cercles indiquent les moyennes correspondant à chaque prélèvement.



Discutons l'allure de la courbe :

La pente de la première montée est rapide, mais est fortement décalée vers la droite par rapport à celle du témoin, ce qui s'exprime par un allongement de la mesure de t2 (I8,4 H au lieu de 7 H.)

La pente de la première descente est également élevée, ce qui montre une synchronisation correcte de la population des cellules marquées.

Par contre, la deuxième montée est très faible, et le niveau maximal ne dépasse pas 25 à 30 %. Cette deuxième partie de la courbe est d'interprétation difficile, et la durée totale du cycle T n'est pas mesurable.

Comment expliquer ces résultats :

Au moment du marquage, la mitose est totale, et les cellules sont bloquées à un ou plusieurs endroits du cycle.

Le marquage a lieu au moment de la mise en retour.
Ce sont les cellules qui sont en cours de phase S qui peuvent se marquer : il y a donc une partie des cellules qui est bloquée en S à la suite du traitement.

D'autre part, des cellules non marquées arrivent en métaphase en même temps que des cellules marquées : cela indique un blocage à un autre niveau que S, en G1 ou en G2.

Il est cependant difficile de retenir l'hypothèse d'un blocage en G1, en raison de la montée rapide de la courbe.

Une partie du blocage a donc lieu pendant la phase G2, et certainement en début de la phase G2 étant donné que des cellules marquées arrivent en métaphase en même temps que des cellules non marquées.

D'autre part, il est possible qu'une autre partie du blocage se fasse pendant la deuxième partie de la phase S, pour les mêmes raisons que précédemment, et aussi parce que l'image de la durée de S est très courte : Ceci peut en effet être le reflet d'une accumulation de cellules au cours de la phase S, ce qui se traduit par une réduction de l'image de cette phase lors de la reprise.

En conclusion, l'étude de cette courbe montre que le barbital à la concentration de 0,50 % agit principalement en bloquant les cellules au niveau fin de S début de G2.

D. ETUDE DE LA DUREE DE LA PHASE S PAR LA METHODE DU MARQUAGE CONTINU.

Cette étude a été réalisée dans le cas de la concentration 0,20 % pour vérifier l'importance de l'allongement de la phase S.

Nous nous sommes placée dans les mêmes conditions expérimentales que dans le cas de l'étude du cycle cellulaire, c'est-à-dire que le marquage et les prélèvements ont été effectués après un traitement préliminaire de 24 H dans la solution de barbital.

Les résultats expérimentaux nous ont permis de tracer les histogrammes de la figure 33 et le graphique de la figure 34.

Ce graphique montre que la durée de la phase S est d'environ 20 H, ce qui correspond à la durée obtenue par la méthode précédente (23,8 H.).

Cependant, l'augmentation du nombre de grains ne se fait pas d'une façon régulière.

On observe en premier lieu une augmentation rapide pendant 6 à 8 H, puis un plateau jusqu'à 16 H, et une nouvelle "montée".

La présence de ce plateau peut s'expliquer par un arrêt de la synthèse d' ADN, du moins dans l'utilisation de la thymidine exogène. En effet, pendant les 8 premières heures, les cellules synthétisent l' ADN en employant plus de thymidine exogène que le témoin (ce qui se traduit par un nombre de grains plus élevé : 30 au lieu de 16). La synthèse de l' ADN au moyen de la thymidine exogène reprend après 16 H. d'action.

D'après l'allure de ce graphique, on peut d'autre part penser que l'arrêt de la synthèse de l' ADN se produit dans la deuxième moitié de la phase S.

F I G U R E 33

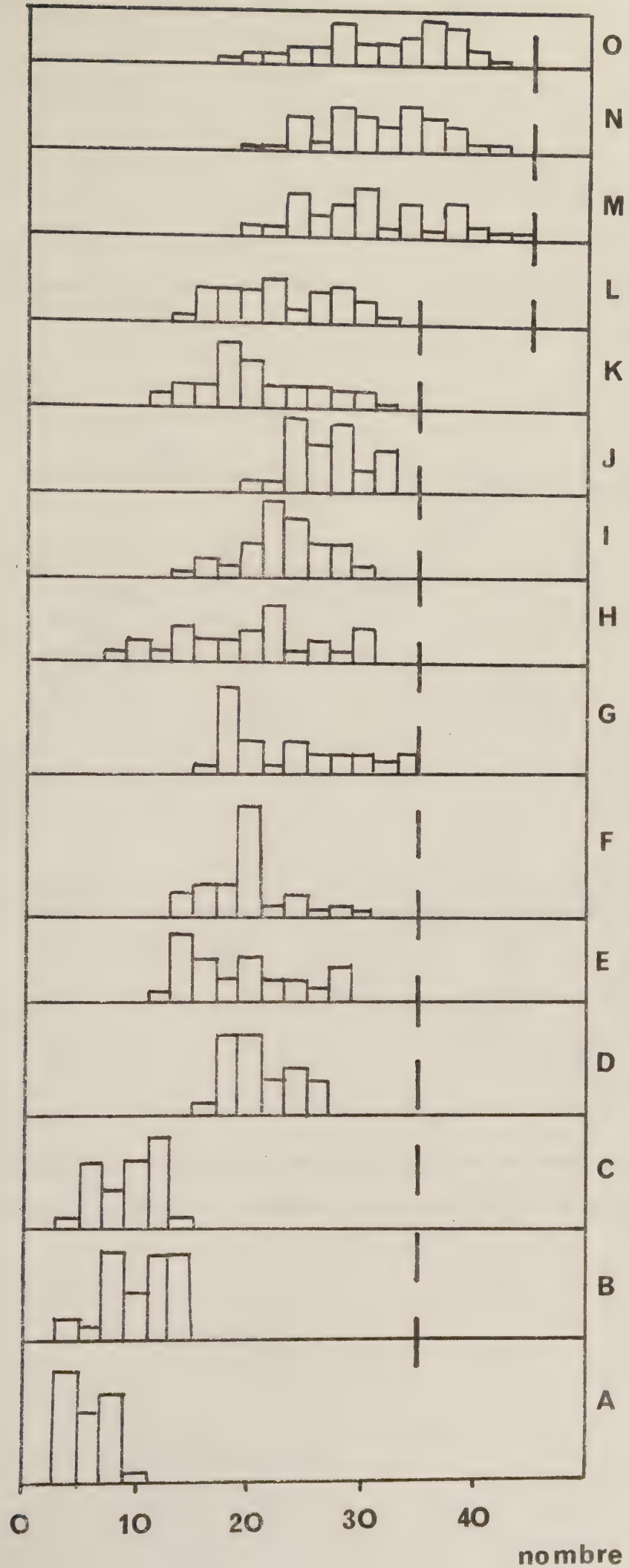
Détermination de la durée de S par la méthode du marquage continu -

Action du BARBITAL à la concentration 0,20 ‰

Les histogrammes représentent la répartition des cellules en fonction du nombre de grains.

A et B	:	2 H	de marquage
C et D	:	4 H	"
E et F	:	6 H	"
G et H	:	10 H	"
I et J	:	14 H	"
K et L	:	16 H	"
M et N	:	20 H	"
O	:	26 H	"

FIGURE 33



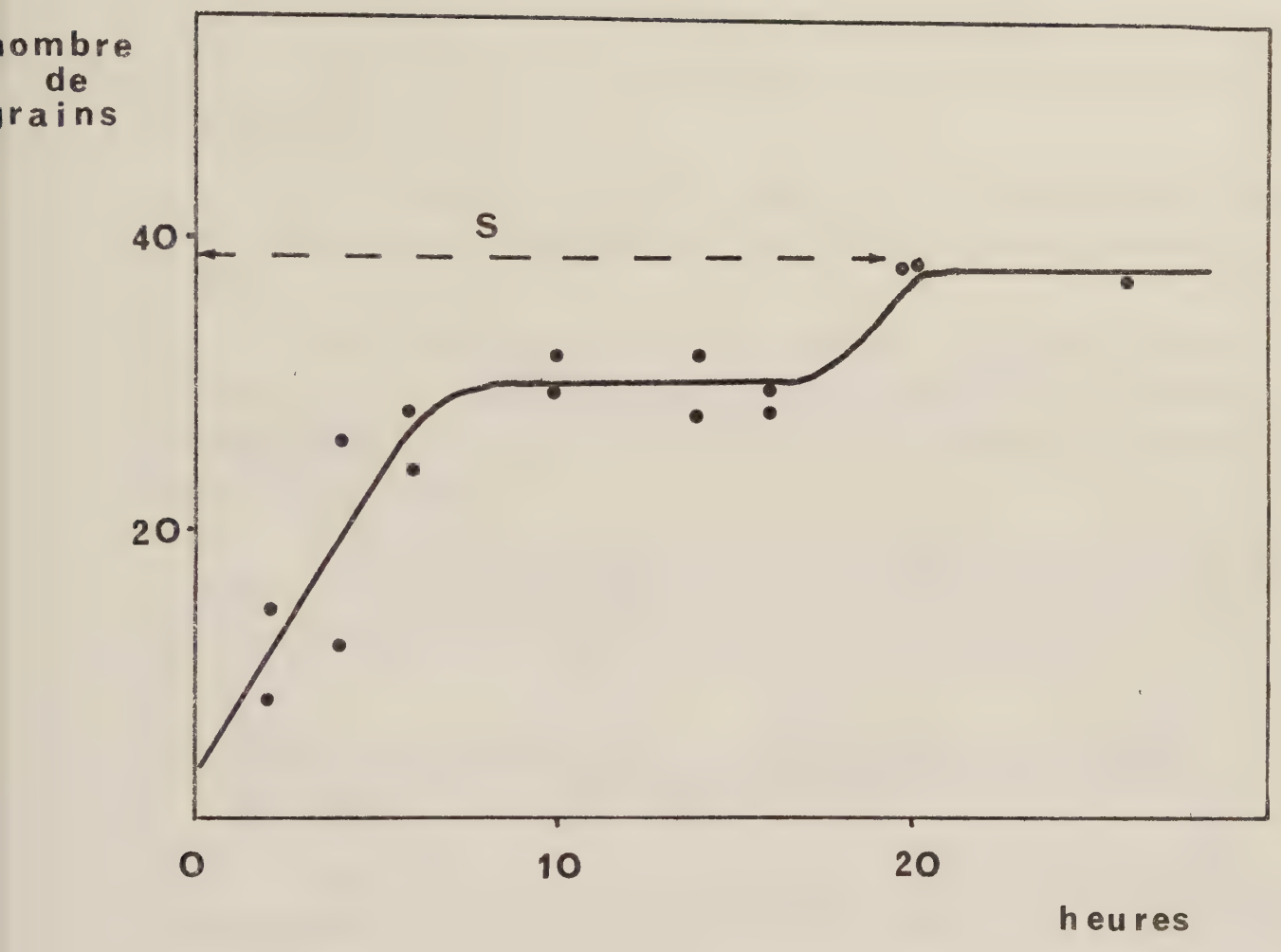


FIGURE 34

Evolution du nombre de grains en fonction du temps.

Marquage continu en présence de BARBITAL à la concentration de 0,20%

E. DETERMINATION DE L'INDEX DE MARQUAGE MAXIMAL.

Nous avons déterminé l'index de marquage maximal pour la concentration de 0,50 %, qui provoque une mitodépression totale rapide.

Le traitement préliminaire a été de 24 H.

Cet index est très inférieur à celui du témoin : 27,3 % contre 62,2 % chez le témoin.

Le nombre de grains par noyau est par contre beaucoup plus élevé dans les cellules traitées : 80 à 100, au lieu de 50 chez le témoin.

Ces résultats montrent que seulement une petite quantité de cellules ont traversé la phase S et incorporé de la thymidine tritiée pendant les 24 H. de marquage (qui correspondent au deuxième jour de traitement).

D'autre part, l'incorporation de thymidine exogène est très élevée, ce qui est sans doute dû à un empêchement de l'apport normal de thymidine endogène nécessaire à la synthèse de l'ADN.

F. ETUDE DES VARIATIONS DE LA REPARTITION DES CELLULES EN FONCTION DU TAUX D'ADN.

Nous avons réalisé cette étude pour la concentration qui provoque une mitodépression totale rapide : 0,50 %.

Des histogrammes ont été établis à des temps différents : 24 H. de traitement, 48 H. de traitement, 24 H. de traitement et 12 H. de retour, 24 H. de traitement et 24 H. de retour.

1.- 24 H. de traitement

La répartition des cellules suivant le taux d' ADN après 24 H. de traitement est bien différente de celle du témoin (figure 35) : on remarque une réduction du nombre des valeurs diploïdes, mais aussi des valeurs tétraploïdes. Par contre, les valeurs intermédiaires sont en plus grand nombre, avec une accumulation vers les valeurs les plus élevées, c'est-à-dire les cellules en fin de S.

Ceci est illustré par le tableau suivant :

	Pourcentage de cellules			
	2 C	intermédiaires	4 C	8C
Témoin	20	34	46	
Traité	10	56	31	3

Cet histogramme met donc en évidence un blocage au niveau fin de S /G2.

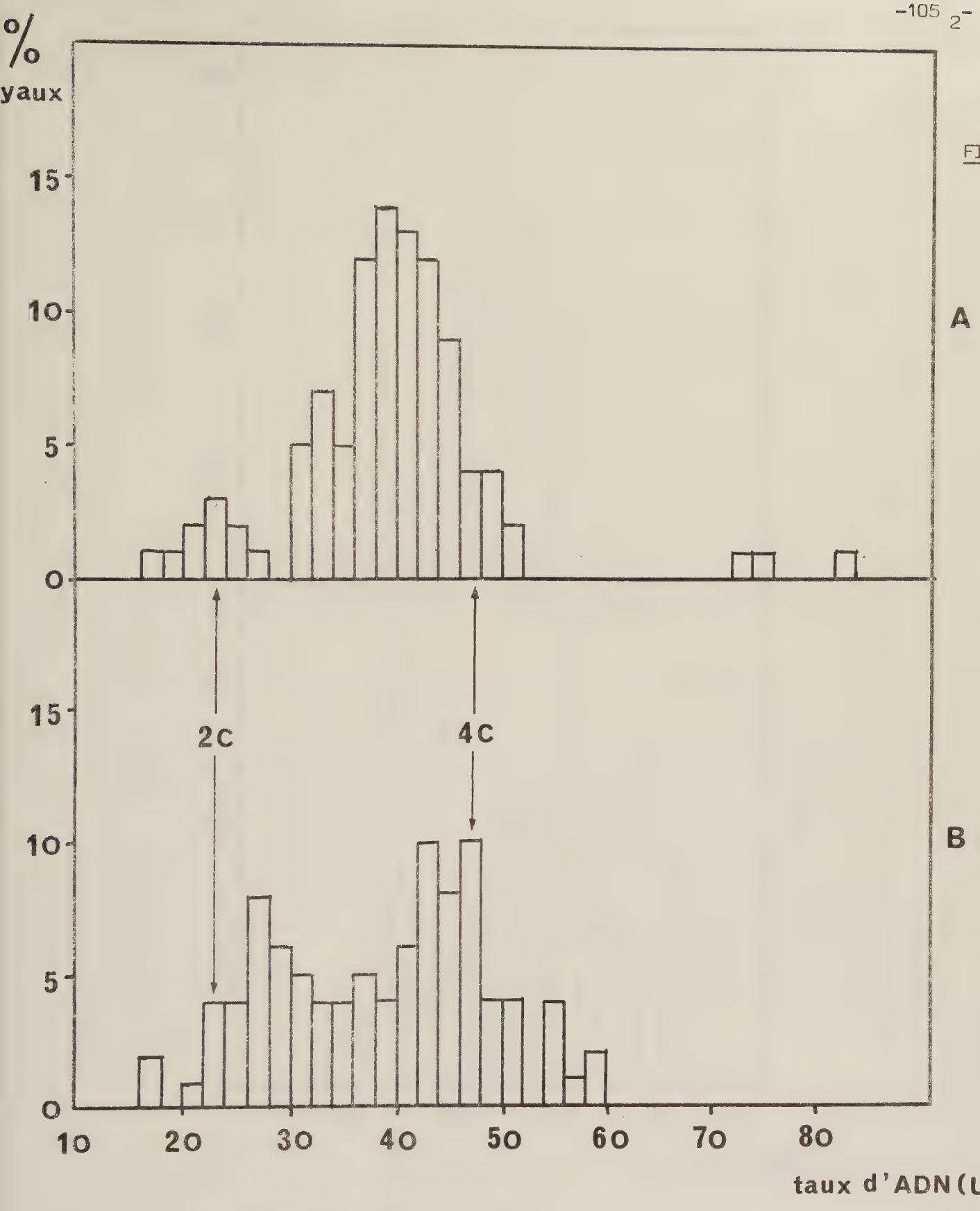
2. 48 H. de traitement

La répartition des cellules est très comparable à la précédente (figure 36) : réduction du nombre de cellules diploïdes et tétraploïdes, avec augmentation du nombre des valeurs intermédiaires. Mais ici l'accumulation en fin de S est beaucoup moins nette.

On peut établir le tableau suivant du même type que le précédent :

	Pourcentage de cellules		
	2 C	intermédiaires	4 C
Témoin	14	33	53
Traité	11	55	34

FIGUR
35

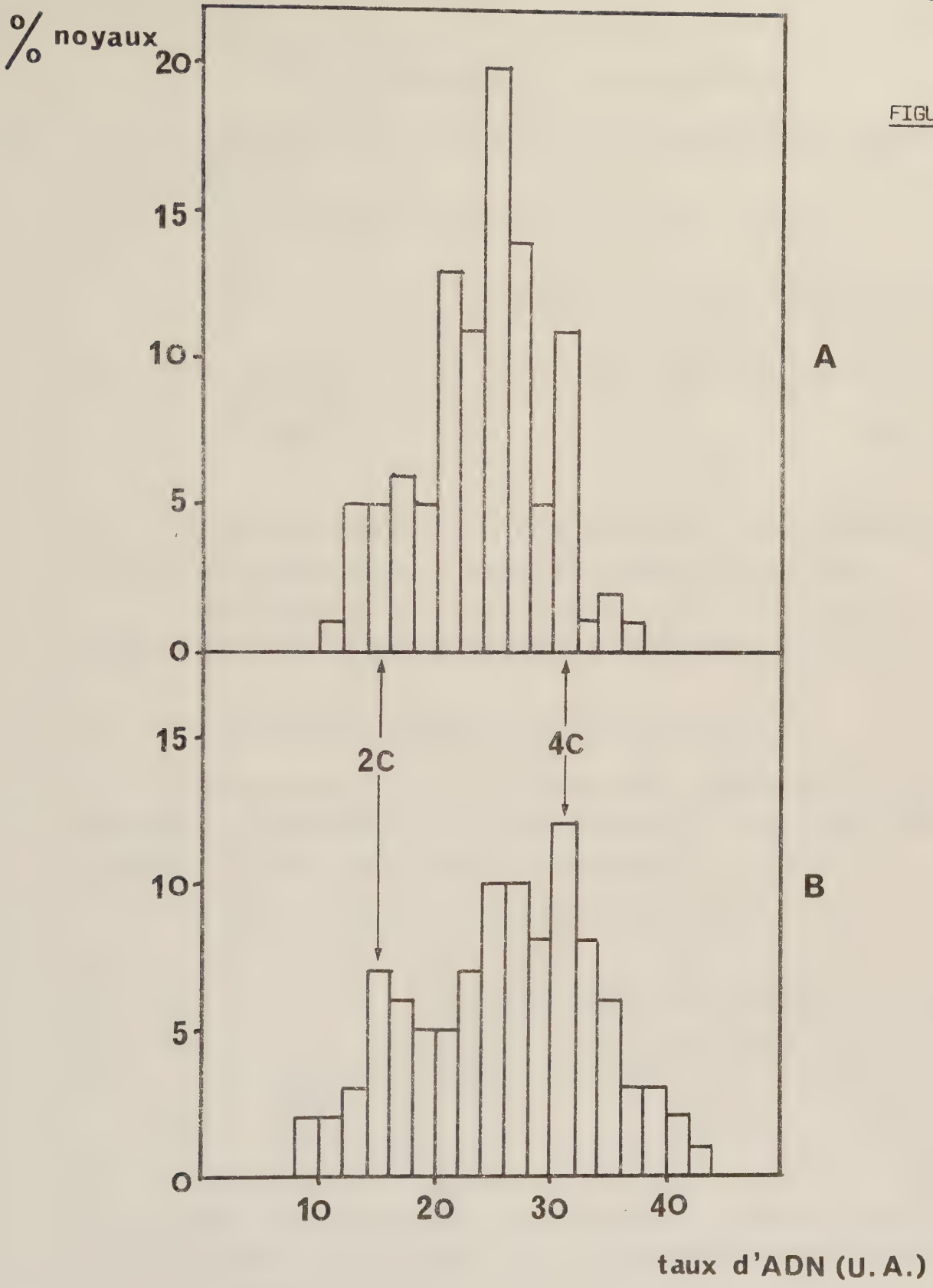


Répartition des cellules en fonction du taux d'ADN

A : BARBITAL 0,50% - Traitement : 24h

B : TEMOIN

FIGURE 36



Répartition des cellules en fonction du taux d'ADN

A : BARBITAL 0,50% - Traitement : 48h

B : TEMOIN

3. - 24 H. de traitement et 12 H. de retour -

L'histogramme correspondant à cette condition est représenté sur la figure 37.

Nous avons établi le tableau suivant :

	Pourcentage de cellules		
	2 C	intermédiaires	4 C
Témoin	18	38	44
Traité	17	31	52

On remarque une diminution du nombre des valeurs intermédiaires, et une augmentation du nombre des valeurs tétraploïdes.

Cela montre que la mise en retour a levé le bloc S/G2, et que beaucoup de cellules sont en phase G2 après 12 H. de retour.

4.- 24 H. de traitement et 24 H. de retour

L'histogramme a une allure différente (figure 38) : on observe une accumulation de valeurs diploïdes, et par contre une réduction du nombre des valeurs tétraploïdes.

Ceci est illustré par le tableau suivant :

	Pourcentage de cellules		
	2 C	intermédiaires	4C
Témoin	12	37	51
Traité	32	41	27

Cette différence peut s'expliquer par le fait que les cellules qui étaient en G2 après 12 H. de retour sont en G1 après 24 H. de retour.

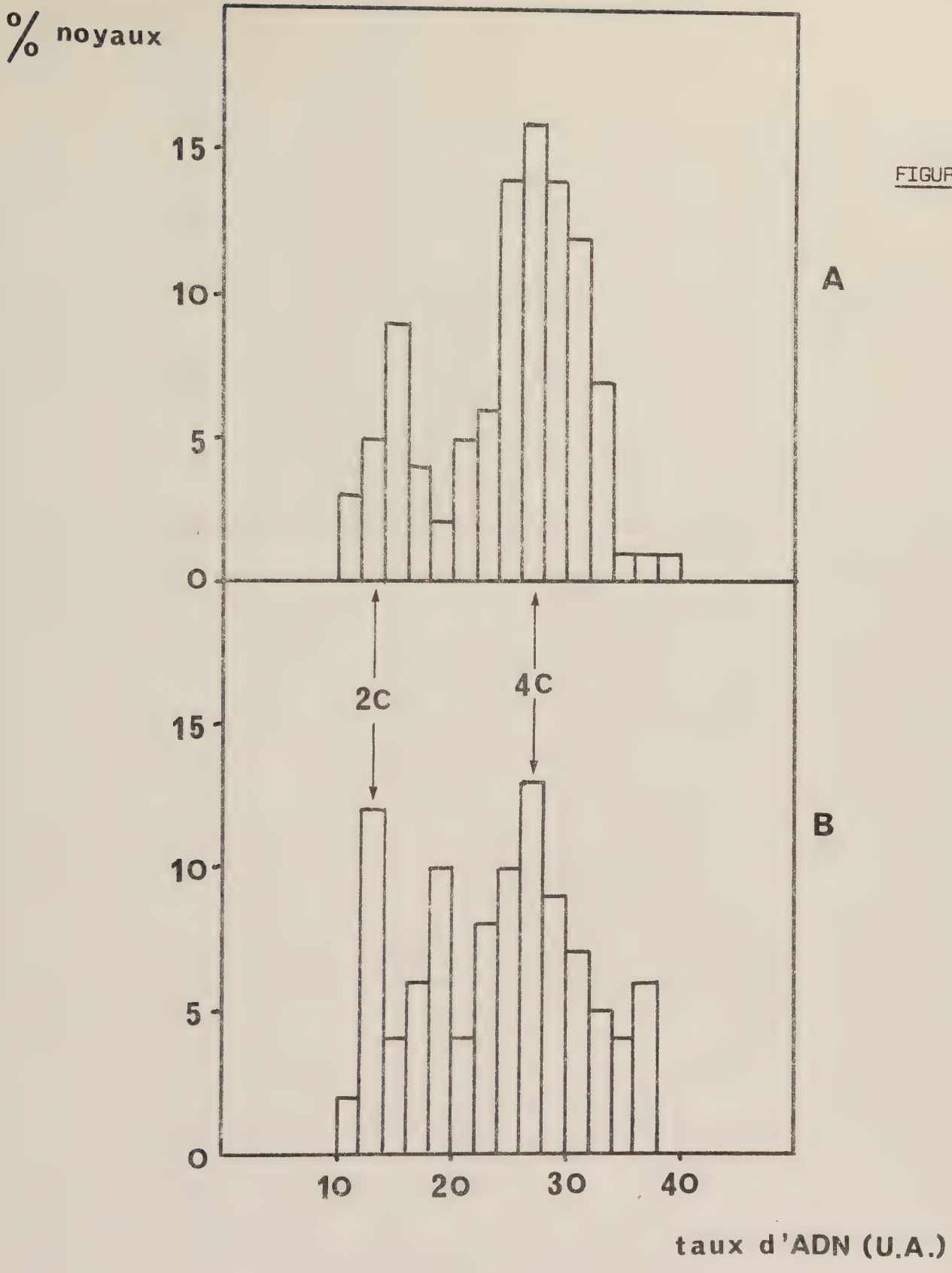


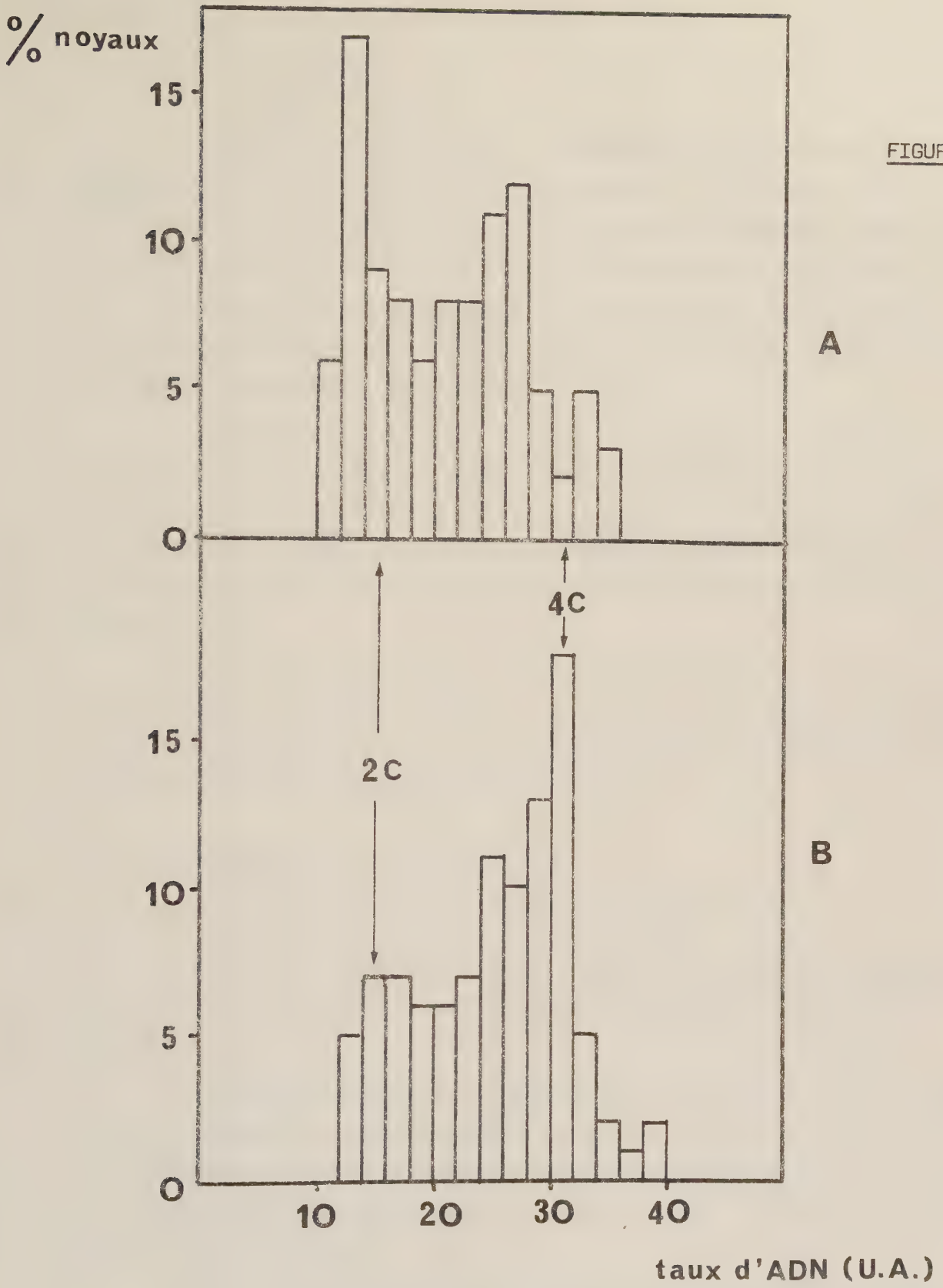
FIGURE 37

Répartition des cellules en fonction du taux d'ADN

A : BARBITAL 0,50% - Traitement 24h et 12h de retour

B : TEMOIN

FIGURE 38



Répartition des cellules en fonction du taux d'ADN

A : BARBITAL 0,50% - Traitement : 24h et 24h de retour

B : TEMOIN

5.- Conclusion

L'étude de ces différents histogrammes met en évidence un blocage des cellules au niveau de la phase S, et plutôt vers la fin de S. Ce blocage à ce niveau est cependant partiel, car, même après 48 H. de traitement, il reste des cellules en G1 et en G2.

La mise en retour entraîne une reprise lente de l'activité : les cellules sont encore en effet en G2 après 12 H de retour, et se trouvent en G1 seulement après 24 H.

Ces résultats viennent appuyer l'hypothèse d'un blocage au niveau fin de S / début de G2 que nous avions formulée lors de l'étude du cycle cellulaire en retour. Après 12H. de retour l'accumulation des cellules en phase G2 s'accorde avec la longueur de t2 du cycle (18,4 H) : les cellules marquées ne sont pas encore arrivées en mitose.

Après 24 H de retour, l'étude du cycle montrait une diminution du pourcentage des métaphases marquées : les cellules marquées atteignaient donc G1, ce qui est en accord avec l'accumulation des cellules diploïdes du dernier histogramme.

G. - DISCUSSION et CONCLUSION -

Reprenons ces différents résultats :

L'étude des variations de la durée des phases du cycle cellulaire a montré une action du barbital principalement au niveau de la phase S :

Fort ralentissement des cellules situées au début ou en cours de S au moment du marquage dans le cas de l'étude en direct à la concentration 0,20 %; blocage en fin de S dans le cas de l'étude en retour à la concentration 0,50 %, ce blocage s'accompagnant d'un autre blocage en début de G2.

L'étude de la durée de la phase S par la méthode du marquage continu dans le cas de la concentration 0,20 % met aussi en évidence un ralentissement des cellules pendant cette phase.

L'allure de la courbe permet en plus d'envisager l'hypothèse d'une action dans la deuxième partie de la phase S, se traduisant par l'arrêt de la synthèse de l' ADN, du moins au dépens de la thymidine exogène.

Pour la concentration 0,50 %, l'index de marquage maximal plus faible que celui du témoin montre la possibilité d'un blocage dans une autre phase que S. D'autre part, l'incorporation de thymidine exogène très élevée est sans doute dûe à un empêchement de l'apport normal de thymidine endogène.

Toujours pour cette concentration, l'étude des variations de la répartition des cellules en fonction du taux d' ADN permet de mettre en évidence un blocage au niveau fin de S /G2; ce blocage est reversible lors de la mise en retour mais la reprise de l'activité est très lente, et les cellules n'atteignent la phase G1 qu'après 24 H.

En conclusion, nous pouvons dire que le barbital pour une concentration donnant une action mitodépressive faible agit principalement au niveau de la phase S, et plutôt au début de la deuxième moitié de cette phase.

Lorsque la concentration est plus élevée, l'action sur la phase S est plus forte et se traduit par un blocage vers la fin de la phase S, qui s'accompagne d'un blocage au début de la phase G2.

Ceci est à rapprocher de l'étude effectuée par OUSTRIN (79) avec un autre barbiturique, le sécobarbital, sur le même matériel :

Après un traitement de 1 H à la dose de 5.10^{-4} M, cet auteur effectue un marquage bref en début de retour pour étudier les modifications du cycle cellulaire.

Sous l'influence du sécobarbital, la distance t2 est très allongée (8 H. au lieu de 4,2 H), la phase S est de 10,8 H au lieu de 12 H, et la durée totale du cycle est de 24 H au lieu de 20 H.

Après discussion cet auteur conclut à un allongement principal de la phase G2, et pense que la " synthèse d' ADN n'est pas perturbée, du moins dans sa durée ".

L'auteur n'envisage pas l'hypothèse d'une action du sécobarbital au cours ou en fin de S. Cette hypothèse nous semble cependant valable, et il serait possible que ce soit aussi un ralentissement au cours de la phase S qui provoque l'allongement de la distance t2, les premières cellules marquées arrivant sans retard en métaphase; ceci s'accorderait avec nos résultats sur l'action du barbital.

C H A P I T R E IV

COMPARAISON DU MODE D' ACTION DE CES TROIS INHIBITEURS

Comme nous l'avons mentionné dans l'introduction générale de la troisième partie, l'antipyrine, l'hydrazide maleïque et le barbital inhibent tous les trois l'entrée des cellules en mitose. Cependant l'étude par le " test Allium " avait montré un mode d'action légèrement différent dans le cas de l'hydrazide maleïque : il n'y avait en effet pas de modification de la proportion des divers stades mitotiques lors de la disparition des mitoses.
Par contre, le barbital et l'antipyrine provoquaient une inhibition de l'entrée en cinèse en même temps que le retour à l'état interphasique de la plupart des prophases bloquées.

Rappelons brièvement leur mode d'action mis en évidence par les méthodes de cinétique cellulaire.

1 - Antipyrine

Pour une faible concentration, l'antipyrine agit au niveau des phases G2 et M.

Pour une plus forte concentration, nous avons observé principalement un blocage du cycle d'une part en G2, d'autre part en fin de S. Dans ce dernier cas, l'approvisionnement en thymidine endogène est insuffisant, ce qui entraîne une augmentation de l'intensité du marquage.

D'autre part, les dosages cytophotométriques de l' ADN révèlent que chez ces cellules la duplication de l'ADN n'a pas été achevée.

2 - Hydrazide maleïque

L'hydrazide maleïque utilisé à faible concentration agit au niveau de la phase S et de la phase G2 principalement, avec peut-être une action sur la phase G1.

A plus forte concentration, l'hydrazide maleïque provoque un blocage des cellules en deux endroits : blocage au niveau de G2, et ce blocage est réversible lors de la mise en retour; et surtout blocage irréversible au niveau de G1 - début de S.

D'autre part, l'intensité du marquage est très faible.

3. Barbital

Le barbital pour une concentration donnant une action mitodépressive faible agit principalement au niveau de la phase S, et plutôt au début de la deuxième partie de cette phase.

Lorsque la concentration est plus élevée, l'action sur la phase S est plus forte, et se traduit par un blocage vers la fin de la phase S, qui s'accompagne d'un blocage au début de la phase G2.

Dans ce dernier cas, on observe une augmentation de l'intensité de marquage.

Si nous comparons les modes d'action sur la cinétique cellulaire de ces trois composés, nous retrouvons le rapprochement entre l'antipyrine et le barbital mentionné précédemment : ces deux composés ont une action principale au niveau des phases S et G2, et on peut préciser deuxième partie de S, début de G2.

Par contre l'hydrazide maleïque a aussi une action au niveau des phases S et G2, mais elle reste secondaire par rapport à l'action au niveau des phases G1 - début de S.

D'autre part, la comparaison de l'intensité de marquage montre que, dans le cas de l'antipyrine comme du barbital, l'apport en thymidine endogène est insuffisant, et que les cellules utilisent surtout pour la synthèse de l' ADN la thymidine tritiée ajoutée au milieu.

Ceci est à rapprocher de l'hypothèse de DEYSSON et DEYSSON (34) : ces auteurs essayèrent mais sans résultat positif d'atténuer l'action mitodépressive de ces composés par un apport extérieur d'uracile. Des travaux biochimiques avaient en effet laissé penser à une substitution de l'uracile par les barbituriques au cours de la synthèse des acides nucleïques (111-13).

Par contre, dans le cas de l'hydrazide maleïque, la thymidine exogène n'est que très peu utilisée par les quelques cellules en phase S.

Cependant, l'antipyrine et le barbital n'exercent pas une action identique : il semble en effet que le barbital exerce une action plus importante au niveau de la phase S. : celle-ci se retrouve lors de l'étude aux faibles concentrations. L'antipyrine au contraire agirait principalement au niveau de la phase G2.

Q U A T R I E M E P A R T I E

DISCUSSION GENERALE

et CONCLUSIONS

DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSIONS

Les méthodes de cinétique cellulaire dans une étude pharmacologique ou toxicologique sur méristèmes végétaux sont encore très peu utilisées : on peut citer en particulier les travaux d'ARCARA et coll. (3), de MAC LEOD (66, 67, 68), de VAN'T HOF (105), ainsi que les travaux d' OUSTRIN (79), de BENBADIS et coll. (7) et les nôtres (12, 11).

La détermination du niveau d'action d'un inhibiteur sur le cycle cellulaire présente cependant un grand intérêt. Elle peut permettre en effet d'aborder d'une façon plus claire l'étude du mode d'action d'un composé, et aussi d'approfondir la connaissance de la biochimie du cycle.

L'étude du mode d'action d'un composé est évidemment facilitée dans la mesure où l'on connaît parfaitement les mécanismes biochimiques de chaque point du cycle. De nombreux travaux sont réalisés actuellement dans ce sens (BASERGA, (5), EPIFANOVA (37).

On distingue quelquefois deux groupes d'inhibiteurs intervenant au niveau du cycle cellulaire (83-84)

- les inhibiteurs " phase dépendants "
- les inhibiteurs " cycle dépendants"

Les premiers interviennent spécifiquement sur une phase donnée du cycle, alors que les deuxièmes agissent indifféremment sur toutes les phases.

Les techniques permettant de déterminer les paramètres de la cinétique cellulaire sont très nombreuses, et nous ne les avons pas toutes envisagées.

Une des plus utilisées est la méthode des mitoses marquées, et certains auteurs se limitent à cette technique (3).

Nous avons montré que la méthode des mitoses marquées donne des indications précises dans l'étude de cellules normales, et les paramètres du cycle cellulaire de nombreuses espèces ont ainsi été déterminés, permettant de distinguer des espèces dont la durée de S est longue, et des espèces dont la durée de S est courte (101). L'ail qui a une durée de S proche de 12H est classé dans la première catégorie.

Il faut retenir de notre étude que la durée du cycle cellulaire et de ses phases est fonction des conditions expérimentales, et les résultats ne sont reproductibles que si les conditions expérimentales sont rigoureusement identiques.

On peut se demander quelle valeur accorder à ces résultats ? Il est possible en effet dans tous les cas de tracer une courbe et de mesurer des paramètres. Mais nous avons vu qu'il était nécessaire d'observer l'allure de la courbe, qui nous renseigne sur la bonne synchronisation de la population de cellules marquées.

Il faut aussi choisir le niveau de mesure des différents paramètres, et nous avons discuté des diverses possibilités. Il est évident que, compte-tenu de ces remarques, les paramètres ne peuvent être déterminés qu'avec une certaine approximation.

Le tracé de la courbe est lui-même un facteur d'erreur lorsque les points expérimentaux sont un peu dispersés.

Nous pensons que l'erreur dans la lecture d'un paramètre peut aller jusqu'à IO %, et qu'il ne faut pas tenir compte de petites différences lorsque l'on compare deux expériences.

En outre, les valeurs ainsi obtenues sont des valeurs moyennes En effet, les cellules, comme nous l'avons déjà dit, ne parcourent pas toutes le cycle à la même vitesse; par exemple si dans une population des cellules ont une durée de S de 4 H et d'autres de 20 H, on obtiendra une valeur moyenne qui dépendra de la proportion des cellules de chacune des catégories, mais on ne sera aucunement renseigné sur l'existence de plusieurs catégories ou sur l'étendue de la dispersion de la population; ceci est un inconvénient qu'il est important de souligner, et qui nécessite l'utilisation complémentaire d'autres techniques.

Dans une étude pharmacologique, on obtient aussi des valeurs moyennes, et ceci est d'autant plus grave que les cellules ne sont pas toutes perturbées de la même façon sous l'action d'un inhibiteur.

La durée du traitement est importante : beaucoup d'auteurs utilisent des traitements très courts (66, 67, 68, 3, 79) et étudient le cycle en retour.

Mais dans ce cas, l'action du produit est très brève si l'on admet son élimination des cellules dès la mise en retour. Si l'inhibiteur est "phase dépendant", il est probable que sont perturbées les seules cellules qui parcourent la phase sensible pendant la durée du traitement;

dans ce cas lors du retour, on obtient des moyennes de cellules bloquées ou ralenties et de cellules non touchées, ces deux populations se mélangeant; les paramètres obtenus ainsi n'ont pas grande signification.

Nous avons essayé d'utiliser des traitements plus longs, d'une durée de 24 H environ. Dans ce cas, toutes les cellules ont le temps de parcourir le cycle pendant la durée de traitement, et elles sont toutes touchées dans de proches conditions. Lors du retour, la population est plus homogène. Mais l'inconvénient est qu'un blocage complet va entraîner une synchronisation du moins partielle, et enlever toute valeur aux paramètres.

L'étude en traitement retour peut être d'autre part conduite de diverses manières : marquage avant le traitement, ou marquage après le traitement. Certains auteurs utilisent simultanément ces deux types d'expériences (66-67). Dans le premier cas, l'addition d'un inhibiteur troublera éventuellement la progression des cellules marquées. Cela sera particulièrement intéressant dans le cas d'une action au niveau de la phase G2, qui sera immédiatement visible (6,66). Mais, dans ce cas, l'action possible sur la phase S est masquée, et l'intervalle de temps séparant l'apparition des premières et des dernières mitoses marquées de la première vague ne correspond pas à l'image de S : un blocage ou un ralentissement des cellules au cours de G2 a en effet pu modifier l'étalement des cellules marquées qui occupaient la moitié du cycle à la fin du marquage, et le paramètre S ne représente pas la durée de cette phase.

Par contre, s'il n'y a pas d'action au niveau de la phase G2, le paramètre mesuré sur la courbe reflétera l'action sur S : les cellules en fin de S au début du traitement atteindront normalement la mitose, alors que les cellules en début de S seront retardées ou au contraire accélérées (66,67).

Si l'on marque après le traitement, (ce qui n'est possible que s'il reste suffisamment de cellules en S aptes à synthétiser de l' ADN dès le début du retour), le cycle est déjà perturbé au moment du marquage, et l'interprétation est souvent difficile : par exemple, une action au niveau de S peut entraîner un retard dans l'apparition des mitoses marquées, donc un allongement du paramètre t2, indépendamment de la durée de la phase G2 (ce que MAC LEOD a observé avec le TCPA (67), et nous-même avec le barbital).

Le paramètre S peut aussi être plus court; mais il reflète en fait non la durée exacte de S, mais un aspect de la population à la fin du traitement : il indique soit une accélération des cellules lorsqu'elles traversent cette phase, soit au contraire un blocage des cellules au cours de cette phase : dans ce cas, lors du retour, les cellules marquées en partie synchronisées n'auront qu'une portion de S à parcourir.

D'une façon générale, un blocage ou un ralentissement des cellules au cours d'une phase peut enlever toute signification à la technique des mitoses marquées : au lieu d'observer l'ensemble de la population répartie sur tout le cycle, on observera en effet une population de cellules groupées, et la courbe obtenue est difficilement interprétable.

De toutes façons, lors d'un retour, l'on observe des cellules qui "récupèrent" peu à peu leur activité normale, et les paramètres lus sur deux cycles ne sont pas compatibles entre eux (ce qui est illustré par les valeurs négatives de G1 que l'on trouve parfois.)

En conclusion, accorder dans de telles conditions une réelle valeur aux chiffres des différents paramètres serait une erreur. Ils permettent seulement d'envisager une hypothèse sur le lieu d'action d'un composé, et nous pensons que, malgré ses inconvénients, la méthode qui consiste à marquer en début du retour après un traitement fournit d'une façon générale plus de renseignements sur l'ensemble du cycle.

Il est intéressant de comparer les résultats des expériences effectuées en retour : nous avons remarqué que très souvent à la suite d'un traitement mitostatique la durée totale du cycle est plus courte : MAC LEOD a observé un raccourcissement de 2 H à la suite d'un traitement au T C P A (67); si l'on observe la courbe obtenue par BENBADIS (6) à la suite d'un traitement au chloramphénicol, on remarque la courte distance séparant les deux vagues de mitoses marquées par rapport à celle du témoin; nous avons trouvé dans l'expérience d correspondant à l'antypirine un raccourcissement de T de 7 H.

Ce raccourcissement peut être expliqué ainsi : il est possible que le blocage des cellules en un niveau du cycle n'empêche pas la continuation de certaines synthèses : lorsque le bloc est levé, les cellules pourraient utiliser immédiatement le stock des composés synthétisés sans avoir à les synthétiser à nouveau, et le cycle serait ainsi accéléré.

Cela montrerait que le blocage cinétique des cellules n'est pas un blocag · total, car certaines synthèses pourraient se produire.

Cette action n'est cependant pas générale : le sécobarbital (79) comme le barbital montrent plutôt un allongement du cycle. L'alcool éthylique prolonge la durée de S et de T (3).

Pour essayer d'éviter tous les inconvénients liés à l'étude des cycles en traitement retour, nous avons réalisé des cycles en traitement direct : dans ce cas, l'inhibiteur est présent pendant toute la durée du cycle. Il est préférable de commencer le traitement 24 H auparavant pour se trouver en présence de cellules déjà "perturbées" au début de l'expérience.

Cette méthode présente cependant un autre inconvénient : elle ne permet en effet que l'étude de l'action de concentrations faibles ne provoquant pas une forte mitodépression, et il est d'autre part souhaitable que la mitodépression varie le moins possible pendant les 48 H d'expérience.

Dans ce cas, on observe la cinétique des cellules "retardées", mais les cellules bloquées échappent à l'observation.

Cette méthode permet sans doute de meilleures conditions d'observation que le traitement retour, mais elle a aussi ses défauts.

En résumé, ces deux méthodes permettent seulement d'envisager des hypothèses sur le lieu d'action d'un composé, et ne se suffisent pas par elles-mêmes.

La méthode cytophotométrique a une optique tout à fait différente : on observe en effet l'ensemble des cellules à un instant donné, et on obtient un aspect de la population totale comprenant les éventuelles cellules en Go ainsi que les cellules qui ne se divisent plus, alors que, comme nous venons de le mentionner, la méthode des mitoses marquées ne permet d'observer que les cellules en mouvement.

Cette méthode convient pour préciser le niveau d'un blocage; il est possible de suivre la "progression" de ce blocage si l'on effectue des prélèvements échelonnés dans le temps. On peut aussi observer la levée du blocage après une mise en retour : la lecture de prélèvements échelonnés nous a permis d'approfondir en particulier le mode d'action de l'hydrazide maleïque en mettant en évidence un blocage réversible au niveau de G2.

Cette méthode des prélèvements échelonnés peut être utile dans le cas d'un blocage du cycle à plusieurs niveaux : l'histogramme de la répartition des cellules à la fin du traitement est en effet difficile à interpréter s'il y a à la fois des cellules bloquées en G1, S, et G2. L'étude de la répartition de ces cellules lors de la mise en retour peut alors apporter d'autres renseignements sur le niveau du blocage.

Nous pensons donc que cette méthode présente un grand intérêt en pharmacologie cellulaire. Elle est malheureusement limitée par le manque de précision de la technique, qui, ainsi que nous l'avons déjà expliqué, porte à la fois sur la mesure et sur l'interprétation des résultats.

A ces deux méthodes, nous avons associé la méthode du marquage continu, qui permet d'évaluer l'index de marquage maximal. Cette détermination est une méthode complémentaire très utile pour aider à l'interprétation dans une étude pharmacologique. Elle permet en effet de connaître le pourcentage de cellules qui peuvent synthétiser l' ADN, donc qui ont traversé S pendant la durée d'un cycle, et elle donne des renseignements sur un blocage éventuel en un autre stade que S.

On associe à cette valeur l'intensité de marquage qui renseigne sur la synthèse de l'ADN en fonction de la thymidine exogène : une intensité plus forte provient d'une plus grande incorporation de thymidine exogène, et fait penser à une déficience en base endogène; une intensité plus faible peut être dûe à un blocage des cellules au cours de S.

Les méthodes de marquage bref et continu sont également utilisées pour déterminer un autre paramètre : le coefficient de prolifération, ou " Growth Fraction ". Ce paramètre permet de connaître la fraction de la population qui est apte à parcourir le cycle.

La connaissance du coefficient de prolifération s'est montrée très vite d'un grand intérêt dans les études de cinétique des cellules tumorales d'origine animale : MENDELSOHN en 1960 et en 1962 (71,72) fut l'un des premiers à le déterminer. L'étude du développement et de la régénération d'un tissu normal utilise aussi ce paramètre (16).

Mais ce coefficient n'est pas facile à déterminer, et cela est reflété par les nombreuses méthodes utilisées (106, 104, 1, 68, 23).

Les calculs sont basés sur le fait qu'à la suite d'un marquage bref avec un précurseur de l'ADN, on obtient des mitoses et des cellules marquées qui parcourent le cycle (" cycling cells"), alors que les cellules non marquées peuvent ou non le parcourir. Le coefficient de prolifération (G F) est égal au rapport :

$$\frac{\text{pourcentage de cellules marquées / cellules totales}}{\text{pourcentage de cellules marquées / cellules parcourant le cycle}}$$

Mais la difficulté est de déterminer le pourcentage de cellules marquées par rapport aux cellules qui parcourent le cycle.

MENDELSOHN (72) considérait ce pourcentage comme égal au pourcentage de mitoses marquées, difficile à chiffrer en raison de la synchronisation des cellules marquées immédiatement après le marquage.

CLOWES (23) indique six façons de calculer le coefficient de prolifération d'après ce principe. Elles font pour la plupart intervenir des paramètres du cycle comme la durée du cycle, la durée de S , la durée de la mitose. Certains font aussi intervenir l'index mitotique.

Nous avons déjà discuté de l'opportunité d'utiliser ces paramètres dans le calcul de la durée de la mitose. Il en est de même ici.

D'autre part, un méristème ne peut pas être assimilé à une population de cellules en croissance exponentielle, et il est délicat d'estimer le coefficient de prolifération de l'ensemble d'un méristème. Ici aussi on obtient un chiffre moyen.

La difficulté est encore plus grande dans une étude pharmacologique : les cellules peuvent en effet être retardées ou accélérées le long du cycle, et cela d'une façon trés hétérogène ; il faudrait donc pouvoir déterminer ce paramètre à un instant précis, ce que ces méthodes ne permettent pas.

Un autre paramètre moins fréquemment utilisé est le "flux cellulaire", ou "cell flow" : c'est le pourcentage de cellules méristématiques qui passent par chaque point du cycle par unité de temps. Le flux est calculé généralement par observation de l'accumulation des cellules en métaphase sous l'action de la colchicine, ou de la formation des cellules binucléées dans le cas d'un traitement à la cafeïne. Une autre méthode consiste à mesurer ce flux à la suite de deux marquages brefs successifs séparés par un intervalle de temps donné (26). La différence du pourcentage des cellules marquées indique alors directement le flux cellulaire.

Ce paramètre s'ajoute aux autres paramètres de la cinétique.

Il peut être intéressant de le déterminer par cette méthode dans une étude pharmacologique : il peut mettre en évidence un ralentissement, un arrêt, ou au contraire une accélération de l'entrée des cellules dans la phase S. Mais on ne peut calculer le flux moyen de l'ensemble des cellules méristématiques que dans le seul cas où l'action du composé est identique à tous les niveaux du cycle et ceci est assez rare :

Si l'on examine les résultats que nous avons exposés, ainsi que d'autres (85, 68, 7), on s'aperçoit que les effets observés sont généralement complexes. Un composé agit le plus souvent en plusieurs endroits, avec peut-être une action prépondérante à un niveau, mais qui s'accompagne d'effets à d'autres niveaux, et il est souvent difficile de les distinguer.

On pourrait penser que l'idéal serait d'utiliser une population de cellules synchrones, car alors on observerait au même moment l'effet à un seul niveau. Cependant, cette méthode qui présente de nombreuses qualités a aussi ses défauts :

Tout d'abord une population synchrone dans des méristèmes végétaux est obtenue seulement après l'action d'inhibiteurs qui bloquent les cellules en un stade. La population synchrone apparaît lors de la mise en retour, mais le cycle retour est raccourci :BRULFERT et DEYSSON (14) ont obtenu après un traitement à l'hydroxyurée qui bloque les cellules au niveau G1/S une durée de T de 16 H au lieu de 23 H chez le témoin, alors que la durée de S est plus courte de 7 H, et que la durée de G2 est aussi raccourcie. Par cette méthode on étudie donc une action pharmacologique sur des cellules déjà perturbées, et ceci peut modifier le mode d'action d'un composé.

BRULFERT et DEYSSON font remarquer d'autre part que la population de cellules synchronisées par l'hydroxyurée est constituée en fait de deux populations : l'une formée de cellules bloquées à la limite G1/S, l'autre de cellules qui étaient déjà en S avant la mise en retour. La population de cellules synchrones n'est donc pas homogène.

Un autre inconvénient est que la synchronisation très bonne lors de la mise en retour se dégrade le plus souvent au bout de peu de temps, et on ne peut pas suivre l'action d'un composé pendant tout un cycle.

Cependant, cette méthode semble présenter un grand intérêt dans les premières heures qui suivent le retour : ainsi, BRULFERT et DEYSSON (14) pensent que, après une synchronisation des cellules d' Allium par l'hydroxyurée, il est possible d'expérimenter sur une population de cellules synchrones en mitose ou en début de phase S.

Une lacune de l'ensemble de ces méthodes est la détermination de la durée de la phase G 1. En effet, cette durée est calculée dans le cas de la méthode des mitoses marquées par différence entre la durée totale du cycle cellulaire et de l'ensemble des autres paramètres. L'erreur de la détermination de chacun des paramètres s'additionne, et l'on obtient une valeur très approchée de la durée de G1.

D'autre part, dans le cas d'une étude pharmacologique, nous avons vu qu'il était parfois impossible de calculer cette durée en raison de la variation des paramètres d'un cycle à l'autre.

BENBADIS et coll (8), puis GIMENEZ-MARTIN et coll. (45) ont mis au point une technique de détermination directe de la durée de cette phase : elle est basée sur le principe d'un double marquage simultané, d'une part morphologique par inhibition de la cytodiérèse, d'autre part métabolique par incorporation continue de thymidine tritiée. L'intervalle de temps qui sépare l'apparition des télophases sans phragmoplaste et le début de l'incorporation de thymidine tritiée par les cellules binucléées correspond à la durée de la télophase plus la durée de G 1.

Cette méthode a permis à BENBADIS et coll (8) de confirmer l'action sur G1 de l'alcool éthylique mise en évidence par ARCARA et coll (3) par la méthode des mitoses marquées. Dans ce cas, ces auteurs se sont assurés que l'association des marquages par la thymidine et par la 2.4 quinazolinedione, effectués simultanément au traitement par l'alcool éthylique, n'introduisait pas de variations dans la réponse des cellules, sinon la mesure de G 1 ne serait évidemment pas possible; c'est sans doute là le point faible de cette technique.

Elle permet cependant d'apporter des données nouvelles : BRULFERT et DEYSSON (14) ont ainsi pu montrer que sous l'action de l'hydroxyurée il se produisait un blocage partiel des cellules à la limite de la phase G1 - S.

En conclusion, nous pouvons dire qu'aucune de ces méthodes employée. séparément n'est pleinement satisfaisante, chacune ayant ses défauts. Cependant, une méthode peut combler les lacunes d'une autre, et là est l'intérêt de l'emploi de plusieurs méthodes. La comparaison des résultats de chacune d'entre elles permet alors d'obtenir des renseignements précis sur la cinétique de l'ensemble des cellules d'un méristème, et sur le lieu d'action d'un composé dans une étude pharmacologique.

Cependant, il n'est pas toujours nécessaire d'accumuler toutes les méthodes, et notre protocole expérimental nous a fourni des conclusions qui nous paraissent intéressantes.

Nous pensons donc que ce protocole peut être appliqué d'une façon générale dans un test pharmacologique :

a. Etude du cycle cellulaire par la méthode des mitoses marquées

Il est intéressant d'effectuer cette étude à la fois en traitement direct et en traitement retour, après un traitement préalable de 24 H avec le composé à étudier.

La concentration du composé doit être choisie avec soin : une mitodépression de 50 % après 24 H de traitement nous semble satisfaisante dans le cas de l'étude en traitement direct à condition que cette dernière varie dans de faibles proportions pendant les 48 H suivantes.

Le cycle en traitement retour donne de bons résultats après une mitodépression totale obtenue en 24 H. Dans ce dernier cas, on peut marquer avant le traitement ou en début du retour suivant le type d'action du composé, mais dans un premier temps il est peut être préférable de marquer après le traitement en début du retour pour obtenir plus de renseignements sur le cycle, ceci dans le cas d'une action sur la phase G2.

b. Détermination de l'index de marquage maximal

Cette détermination est rapide, et il est intéressant de lui associer la détermination du nombre maximal de grains après 24 H de marquage, cette valeur étant un reflet de l'incorporation de la thymidine exogène.

c. Détermination du taux d' ADN par cytophotonétrie

Cette méthode apporte des meilleurs résultats lorsque l'on utilise une concentration assez forte entraînant une mitodépression totale, donc un blocage des cellules.

Il nous paraît logique d'utiliser la même concentration que celle employée dans l'étude du cycle en retour par la méthode des mitoses marquées, de façon à pouvoir comparer les résultats.

Nous pensons que cinq temps différents de traitement permettent une bonne conclusion : 12 H, 24 H et 48 H de traitement d'une part pour observer le blocage des cellules, 24 H de traitement et 12 H de retour, 24 H de traitement et 24 H de retour d'autre part pour suivre le " démarrage " des cellules bloquées.

Il est évident que cette méthodologie n'est pas rigide, et qu'elle doit être adaptée à chaque cas particulier. Mais nous pensons qu'elle peut servir de base dans l'élaboration du plan d'une étude pharmacologique.

RESUME DES PRINCIPAUX RESULTATS

Après avoir réalisé une étude bibliographique des diverses techniques de cinétique cellulaire, nous avons mis au point le protocole expérimental de trois méthodes différentes :

- la méthode des mitoses marquées
- la méthode du marquage continu
- la méthode cytophotométrique

Nous avons dans un deuxième temps appliqué ces méthodes à l'étude de la prolifération des cellules de méristèmes radiculaires d' Allium sativum L. pour bien déterminer les caractéristiques de notre matériel.

L'étude de la durée du cycle cellulaire et de ses phases par la méthode des mitoses marquées nous a permis de retenir les paramètres suivants :

T	= 23 H
G2	= 5 H
S	= 11,9 H
G1	= 2,6 H
M	= 3,5 H

La détermination de la durée de S par marquage continu nous a donné une valeur comparable à la précédente : S est compris entre 11 H et 12 H.

L'index de marquage maximal s'est montré assez faible : 60 % environ, et la discussion nous a amenée à conclure que dans nos conditions expérimentales nous observons des cellules méristématiques aptes à se diviser mais aussi des cellules déjà différenciées métaboliquement bien qu'elles ne le paraissent pas morphologiquement et qui ne se divisent plus.

La méthode cytophotométrique nous a montré une répartition comparable sur différents histogrammes : dans l'ensemble le lot de cellules diploïdes est moins important que le lot de cellules tétraploïdes, et le nombre des valeurs intermédiaires est plus élevé du côté des fortes valeurs.

Dans un troisième temps, nous avons utilisé ces méthodes pour essayer de déterminer le lieu d'action de trois inhibiteurs de la mitose : l'antipyrine, l'hydrazide maleïque et le barbital, ceci afin de vérifier l'intérêt de ces méthodes. Nous avons obtenu les résultats suivants :

L'antipyrine suivant la concentration utilisée allonge les phases G2 et M, ou bloque le cycle cellulaire partiellement en fin de S et partiellement en cours de G2, ceci s'accompagnant d'un approvisionnement insuffisant en bases endogènes.

L'hydrazide maleïque à faible concentration agit au niveau de la phase S et de la phase G2, avec peut être une action sur la phase G1. A plus forte concentration, l'hydrazide maleïque provoque un blocage des cellules en deux endroits : blocage au niveau de G2 (qui est réversible lors de la mise en retour), et blocage irréversible au niveau de G1 - début de S.

Le barbital pour une concentration provoquant une mitodépression faible agit principalement au niveau de la phase S, et plutôt au début de la deuxième moitié de cette phase. Lorsque la concentration est plus élevée, l'action sur la phase S est plus forte et se traduit par un blocage vers la fin de la phase S qui s'accompagne d'un blocage au début de la phase G2.

Au cours de la discussion générale, nous avons souligné les difficultés et les limitations de chacune de ces méthodes, et la nécessité de comparer les résultats de plusieurs d'entre elles de façon à combler les lacunes éventuelles.

Nous avons en conclusion proposé un protocole expérimental pouvant servir de base dans une étude pharmacologique.

B I B L I O G R A P H I E

1. ADOLPHE (M.), 1969 - Etude comparée des caractéristiques physiologiques en culture *in vitro* de deux lignées cellulaires hétéroploïde (Hela) et diploïde (L. 809) Application en pharmacologie .
Thèse doct. Pharm. (Etat), PARIS.

2. ADOLPHE (M.), DEYSSON (G.), LECHAT (P.), 1969. Etude à l'aide de l'index de marquage maximal des actions exercées sur le cycle cellulaire par quelques antiinflammatoires.
C. R. Acad. Sc. PARIS, 269, p. 931 - 933.

3. ARCARA (P.G.) et VITTORIA NUTI RONCHI, 1967 - Effect of ethyl alcohol on the mitotic cycle of *Allium cepa* root meristems.
Caryologia, 20, 3, p. 229-232.

4. AVANZI (S.), BRUNORI (A.), D' AMATO (F.), VITTORIA NUTI RONCHI AND SCARASCIA MUGNOZZA (G.T.), 1963. Occurence of 2C (G1) and 4 C (G2) nuclei in the radicle meristems of dry seeds in *Triticum durum* Desf. Its implications in studies on chromosome breakage and on developmental process .
Caryologia, 16, 2, p. 553-558

5. BASERGA (R.), 1968 - Biochemistry of the cell cycle : a review.
Cell tissue kinet. 1, p. 167-191.

6. BENBADIS (M.C.), 1970. Prolifération et différenciation cellulaires dans le méristème radiculaire d' *Allium Sativum* L : action du chloramphenicol -
Bull. Soc. bot Fr. Mémoires 117, p. 125-144.

7. BENBADIS (M.C.) LEVY (F.), PAREYRE (C.) et DEYSSON (G.), 1971. Le cycle cellulaire dans les méristèmes radiculaires d' Allium sativum L. sous l'influence d'inhibiteurs de la synthèse protéïque: action comparée du chloramphénicol, du cycloheximide et de la tubulosine -
C.R. Acad. Sc., 272, p. 707-710.

8. BENBADIS (M.C.), LEVY (F.), PAREYRE (C.), 1971 - Méthode de détermination directe de la durée de la période G1 du cycle cellulaire dans les méristèmes radiculaires.
C.R. Acad. Sc, 273, p. 352-355.

9. BOIVIN (A.), VENDRELY (R.) et VENDRELY (C.), 1948. L'acide désoxyribonucleïque du noyau cellulaire, dépositaire des caractères héréditaires; arguments d'ordre analytique -
C.R. Acad Sc, 226, p. 1061-1063.

10. BONALY (J.), 1969. Les phases du cycle cellulaire : méthodes de détermination par les techniques autoradiographiques - Application : essai d'analyse des effets de l'antipyrine sur le cycle cellulaire.
Mém. dipl. Et. Sup. Sciences PARIS.

11. BONALY (J.), 1971 - Modifications du cycle cellulaire sous l'influence de l'hydrazide maleïque dans les méristèmes radiculaires d'Allium sativum L.
C.R. Acad. Sc., 273, p. 150-153 -

12. BONALY (J.) et DEYSSON (G.) 1970, Modifications expérimentales du cycle cellulaire étudiées sur le méristème radiculaire d' Allium sativum L. II. Influence de l'antipyrine.
Ann. Ph. Fr., 28, p. 677-684.

13. BRACHET (J.), 1945. Action de l'acide barbiturique sur l'oeuf de grenouille en voie de développement.
C.R. Soc. Biol., 139, p. 782-791.

14. BRULFERT (A.) et DEYSSON (G.), 1972. Synchronisation des divisions des cellules méristématiques d' Allium sativum L. par l'hydroxyurée. Conditions d'application à l'analyse cinétique des effets cytotoxiques. (Acad. de Pharm. Séance de déc.)
Ann. Pharm. Fr. sous presse .

15. BRYANT (T.R.), 1969 - Hydrolysis in Feulgen autoradiography.
Exp. Cell. Res. , 56, p. 127-133.

16. BUCHER (N.L.R.), 1963. Regeneration of mammalian liver
Inter. R. Cytol., 15, p. 245-300.

17. CASPERSSON (T.), 1936. Über den chemischen Aufbau der Strukturen des Zell kerns .
Skand. Arch. Physiol., 73, Suppl. 8, p. 1-151-

18. CLEAVER (J.E.), 1967 - Thymidine metabolism and cell kinetics.
Frontiers of Biology, 6, North Holland pub. AMSTERDAM .

19. CLEAVER (J.E.), 1967. Thymidine metabolism : the four factor model pool sizes and growth inhibition. In " Thymidine metabolism and cell kinetics".
Frontiers of Biology, 6, North Holland pub. AMSTERDAM.

20. CLEAVER (J.E.), 1967. Interphase replication of DNA and the cell cycle. In "Thymidine metabolism and Cell kinetics".
Frontiers of Biology, 6, North Holland pub. AMSTERDAM.

21. CLEAVER (J.E.) et HOLFORD (R.M.), 1965 - Investigations into the incorporation of 3 H- thymidine into DNA in L. strain cells and the formation of a pool of phosphorylated derivatives during pulse labelling.
(Biochim. Bioph. Acta, 103, p. 654-671

22. CLOWES (F.A.L.), 1965. The duration of the G1 phase of the mitotic cycle and its relation to radiosensitivity.
New phytologist, G.B. 64, 3, p. 355-359.

23. CLOWES (F.A.L.), 1971 - The proportion of cells that devide in root meristems of Zea mays L.
Ann. Bot, 35, p. 249-261.

24. CONGER (A.D.) et FAIRCHILD (L.M.), 1953. A quick freeze method for making smear slides permanent.
Stain technol., 28, 6, p. 281-283.

25. DEITCH, (A.D.), WAGNER (D.) and RICHART (R.M.), 1968. Condition influencing the intensity of the Feulgen reaction
J. Histochem - Cytochem., 16, 5, p. 371-379

26. DE LA TORRE (C.), GONZALEZ-FERNANDEZ (A.), and GIMENEZ - MARTIN (G) 1971. Cell flow and its application to the estimate of cell cycle parameters in meristems.
Biol. Zbl, 90, p. 707-710.

27. DEYSSON (G.), 1948. Contribution à l'étude du synchrome mitoclasique
Thèse Doct. Pharm. (Etat) PARIS.

28. DEYSSON (G.), 1949- Action mitodépressive de l'antipyrine.
C.R. Acad. Sc., 228, p. 1047-1049.

29. DEYSSON (G.), 1961. Les effets des composés chimiques antimitotiques sur la cellule végétale : leur intérêt pour la physiopathologie des mitoses.
Chemotherapia, 2, p. 138-162.

30. DEYSSON (G.), 1963. La pharmacologie cellulaire : ses buts et ses méthodes.
Actualités pharmacol. (PARIS), 16. p. 61-96.

31. DEYSSON (G.) et DEYSSON (M), 1953- Recherches sur le mécanisme biochimique de l'action des poisons mitotiques. I. Un apport extérieur d'uracile peut-il s'opposer à l'action mitostatique exercée par le barbital, l'antipyrine et l'hydrazide maleïque ?
Bull. Soc. Chim biol, 35, IO, p. 1209-1215

32. DEYSSON (G.), et ROLLEN (A.), 1951. Anomalies mitotiques provoquées par la diéthylmalonylurée (véronal) chez l' Allium cepa L.
(C.R. Ac. Sc. PARIS, 232, p. 548-549.

33. DEYSSON (G.) et ROLLEN (A.), 1951. Action mitostatique de la diéthylmalonylurée (véronal) chez l' Allium cepa L.
C.R. Ac. Sc. PARIS, 232, p. 873, 875

34. DEYSSON (G.) et ROLLEN (A.), 1951. Sur l'action antimitotique de l'hydrazide maleïque.
C.R. Ac. Sc. PARIS, 233, p. 820-821.

35. DONIACH (J.) et PELC (S.R.), 1950 - Autoradiographie technique
Brit. J. Radiol., 23, p. 184-192.

36. DURAND (M.) et FAVARD (P.), 1967. La cellule
Collection méthodes HERMANN PARIS Ed.

37. EPIFANOVA OLGA (I.), SMOLENSKAYA (I.N.), SEVASTYANOVA (M.V.), et KURDYLIMOVA (L.G.), 1969- Effets of actinomycin D and puromycin on the mitotic cycle in Synchronized cell culture.
Exp. Cell Rés., 58, p. 401-410.

38. EVANS (H.J.), 1964. Uptake of ^{3}H- thymidine and patterns of DNA replication in nuclei and chromosomes of Vicia faba
Exp. Cell Res., 35, p. 381-393.

39. EVANS (H.J.) et SCOTT (D.) 1964. Influence of DNA synthesis on the production of chromatid aberrations by X rays and maleic hydrazide in Vicia faba
Genetics, 49, p. 17-38

40. FEULGEN (R.) und ROSSENBECK (M.) 1924. Mikroskopisch chemistür Nachuveiss eimer Nuckleinsaüre vom Typus der Thymonukleinsäure und die darauf beruhende elektive Färbung von Zellkernen in mikroskopischen Präparaten.
Hoppe Seylers Z., 135, p. 203-248.

41. FIRKET (H.), 1958. Recherches sur la synthèse des acides désoxyribonucleïques et la préparation à la mitose dans des cellules cultivées " in vitro".
Arch-Biol., 69, p. 1-166

42. FRIED (J.), 1970. Mean, géometric mean or median grain count in cell cycle studies.
Exp. Cell Res. , 59, p. 447-451.

43. GHOSH (T.N.), 1969. Quantitative study of DNA (Feulgen), in Entamoeba invadens.
Exp. Cell Res, 56, p. 97-104.

44. GILLES (A.), 1954. Notes du Cours de Cytogénétique végétale. Institut Carnoy - LOUVAIN

45. GIMENEZ-MARTIN (G.), GONZALEZ-FERNANDEZ (A.), and DE LA TORRE (C) 1971. Direct measurement of the G1 phase in meristematic cells at two different températures.
Cell Tissue Kinet., 4, p. 563-567.

46. GONZALEZ-FERNANDEZ (A.), LOPEZ-SAEZ (J.F.) and GIMENEZ-MARTIN (G.), 1966. Duration of the division cycle in binucleate and mononucleate cells.
Exp. Cell Res., 43, p. 255-267.

47. GRANT (C.J.) et HESLOT (H.), 1965. Remaniements chromosomiques induits par les nitrosamines chez Vicia faba et leur relation avec le cycle mitotique.
Ann. Gen., 8, 2, p. 98-104.

48. GRENWOOD (M.S.) and BERLYN (G.P.), 1968 - Feulgen cytophotometry of pine nuclei, effects of fixation, role of formalin.
Stain technol, 43, 2, p. 111-117.

49. GREULACH (V.A.) et ATCHISON (E.), 1950. Inhibition of growth and cell division in onion roots by maleic hydrazide.
Bull. Torrey bot. club, 77, p. 262-267.

50. HALLET (J.N.), 1970. Etude cytophotométrique de la teneur en DNA nucléaire des cellules de l'apex du gamétophyte feuillé chez le Polytrichum formosum Hedw.
C.R. Acad. Sc., 271, p. 1982-1985

51. HALLET (J.N.), 1970 - Evolution du contenu nucléaire en DNA au cours de la différenciation cellulaire dans le gamétophyte du Polytrichum formosum Hedw.
C.R. Acad. Sc., 271, p. 2110- 2113.

52. HOWARD (A.) et PELC (S.R.), 1951. Nuclear incorporation of ^{32}P as demonstrated by autoradiographs.
Exp. Cell Res., 2, p. 178-187.

53. HOWARD (A.) et PELC (S.R.), 1953. Synthesis of deoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage.
Heredity (Suppl.), 6 , p. 261-273.

54. IVERSEN (O.H.), 1967 - Cell loss in malignant tumours in man.
Europ. J. Cancer, 3, p. 235

55. JENSEN (W.A.), 1962 - Autoradiography -
In "Botanical Histochemistry", Ed. Freeman W.H. and Comp., U.S.A.

56. JOFFES (D.L.) et WARREN (S.), 1955 - Simplified liquid émulsion radioautography.
J. Biol. Phot. Assoc., 23, p. 145-150.

57. JONA (R.), 1966. La durata del ciclo mitotico nella Bellavia romana determinata per via autoradiographica mediante l'impiego della timidina ^{3}H.
Caryologia, 19, 4, p. 429-442.

58. LAJTHA (L.G.) et GILBERT (C.P.), 1967 - Kinetics of cellular proliférations .
Adv. in Biol. Med. Phys. 11, p. 1 - 25.

59. LAJTHA (L.G.), OLIVER (R.) et ELLIS (F.), 1954. Incorporation of ^{32}P and adenine ^{14}C into DNA by human bone marrow cells in vitro
Brit. J. Cancer, 8, p. 367-379.

60. LAJTHA (L.G.), OLIVER (R.) et GURNEY (C.W.), 1962.
Kinetic model of a bone marrow stem cell population.
Brit. J. Haematal., 8, p. 442-460.

61. LAMERTON (L.F.) et STEEL (G.G.), 1968. Cell population kinetics in normal and malignant tissues.
Prog. in Bioph. Molecular Biol, 18, p. 247-283.

62. LAZAR (P.) et GERARD MARCHANT (R.) 1965. Une technique de représentation graphique des numérations de grains sur autohistoradiographie.
Ann. Histochem., 10, p. 43-52.

63. LIST (A.J.), 1963. Some observations on DNA content and cell and nuclear volume growth in the developing xylem cells of certain higher plants .
Amer. J. Bot., 50, p. 320-329.

64. LOBOV (V.P.), 1971. Effect of maleic hydrazide on biosynthesis of protein, RNA, and DNA in the roots of pea seedlings.
Plant Physiol., USSR Acad. of Sc., MOSCOU, 18, 1, p. 116-120.

65. LOPEZ-SAEZ (J.F.), GIMENEZ-MARTIN (G) et GONZALEZ-FERNANDEZ (A.), 1966. Duration of the cell division cycle and its dépendance on température.
Z. Zellforach, 75, p. 591-600.

66. MAC LEOD (R.D.), 1968. Changes in the mitotic cycle in lateral root meristems of Vicia faba following kinetin treatment.
Chromosoma (Berl.), 24, p. 177-187 -

67. MAC LEOD (R.D.), 1969. Some effects of 2,4,5 trichlorophenoxyacetic acid on the mitotic cycle of lateral root apical meristems of Vicia faba.
Chromosoma (Berl.), 27, p. 327.337.

68. MAC LEOD (R.D.), 1971. The response of apical meristems of primary roots of Vicia faba L. to colchicine treatments.
chromosoma (Berl.), 35, p. 217-232.

69. MALONEY (M.A.), PATT (H.M.) et WEBER (C.L.), 1962 - Estimation of deoxyribonucleic acid synthetic period for myclocytes in dog bone marrow
Nature, 193, p. 134-135.

70. MATAGNE (R.), 1968. Duration of mitotic cycle and patterns of DNA replication in chromosomes of Allium cepa .
Caryologia, 21, 3, p. 209-224.

71. MENDELSOHN (M.L.), 1960 - The growth fraction, a new concept applied to tumors.
Science, 132, p. 1496.

72. MENDELSOHN (M.L.), 1962 - Autoradiographie analysis of cell proliferation in spontaneous breast cancer of C 3 H mouse III the growth fraction.
J. Natl. Cancer Inst., 28, p. 1015

73. MICHAUX (N.), 1971, Structure et fonctionnement du méristème apical du Pteris cretica L. II Etude cytophotométrique.
Ann. Sc. Nat. Bot. PARIS, 12 Série, 12, p. 147-188.

74. MITCHISON (J.M.), 1971 - The biology of the cell cycle -
Ed. Cambridge University Press.

75. MORTIMER (L.), MENDELSOHN (M.D.), 1958 - The two wavelength method of microspectrophotometry. IIA set of tables to facilitate the calculations.
J. Biophys. and Biochem. Cytol, 4, 4, p. 415-424 -

76. MURIN (A.), 1967. The effects of temperature on the mitotic cycle and its time parameters in root tips of Vicia faba
Naturwissenschaften, 53, p. 312 - 313

77. ORNSTEIN (L.), 1952. The distributional error in microspectrophotometry.
Lab. Invest., 1, p. 250-265.

78. OSTERGREN (G.), 1944 - Colchicine mitosis, chromosome contraction, narcosis and protein chain folding.
Hereditas, 30, p. 429-467.

79. OUSTRIN-LAPUYADE (M.L.), 1970. Les tests végétaux en toxicologie expérimentale (cas particulier des barbituriques)
Thèse Doctorat Etat Pharmacie TOULOUSE.

80. PAINTER (R.B.) et DREW (R.M.), 1959. Studies on deoxyribonucleic acid metabolism in human cancer cell cultures (Hela).
Lab. Invest., 8 , p. 278-285.

81. PATAU (K.) 1952 - Absorption microphotometry of irregular shaped objects .
Chromosoma (Berl.), 5 p. 341-362.

82. POLLISTER (A.W.) et RIS (H.), 1947. Nucleoprotein determination in cytological preparations.
Cold Spring Ha rbor Symp. Quant. Bioli, 12, p. 147-157

83. POUILLART (P.) et MATHE (G.), 1971 - Cinétique et chimiothérapie
In "La Cinétique de prolifération cellulaire" (Séminaire INSERM), p. 355-374.

84. POUILLART (P.), SCHWARZENBERG (L.), MATHE (G.), SCHNEIDER (M.), JASMIN (C.), HAYAT (M.), WEINER (R.), DE VASSAL (F.), AMIEL (J.L.) BEYER (H.P.) et FAJBISOWICZ (S), 1972. Essai clinique de combinaisons chimiothérapiques basées sur la notion de tentative de synchronisation cellulaire. Administration première d'un antimitotique suivie de l'application de produit(s) cycle ou phase dépendant(s)
La nouv. Presse méd., 1, 26, p. 1757-1762

85. QUASTLER (H.) et SHERMAN (F.G.), 1959. Cell population kinetics in the intestinal epithelium of the mouse.
Exp. Cell Res., 17, p. 420-438.

86. REFSUM (S.B.), BERDAL (P.), 1967 - Cell loss in malignant tumours in man.
Europ. J. Cancer, 4, p. 235.

87. REMBUR (J.), 1970 - Etude autoradiographique et cytophotométrique de la synthèse du DNA au cours des premières heures de la germination chez le xanthium pennsylvanicum Wahl (ambrosiacées)
C.R. Acad. Sci, 271, p. 908-911

88. ROELS (H.), 1965 - Die plug méthode.
Acta Histochem. Suppl., 6, p. 73-79.

89. SAVAGE (R.E.) et PLAUT (W.), 1958. The effect of HCl hydrolysis on the retention of thymidine in DNA.
J. Biophys. Biochem. Cytol., 4 , p. 701-706.

90. SCHOENE (D.L.) et HOFFMANN (O.L.), 1949 - Maleic hydrazide, a unique growth regulator.
Science, 109, p. 588-590.

91. SISKEN (J.E.), 1964 - Méthods for measuring the length of the mitotic cycle and the timing of DNA synthesis for mammalian cells in culture.
In Methods in cell physiology, I , Academic Press, ed NEW YORK.

92. STANNERS (C.P.) et TILL (J.E.), 1960 - DNA synthesis in individual L strain mouse cells.
Biochim. Biophys. Acta, 37, p. 406-419

93. STOWEL (R.E.), 1945 - Feulgen reaction for thynonucléic acid
Stain Technol, 20, p. 45-58

94. SWIFT (H.), 1950 - The desoxyribose nucleic acid content of animal nuclei.
Physiol. Zool. , 23, p. 169-198.

95. TAYLOR (E.W.), 1960 - Nucleic acid synthesis in relation to the cell division cycle.
Ann. N. Y. Acad. Sc. , 90 , p. 409-421.

96. THOMPSON (J.) et CLOWES (F.A.L.), 1968 - The quiescent center and rates of mitosis in the root meristem of Allium sativum.
Ann. Bot., N.S., 32, p. 1-13.

97. TUBIANA (M.) 1968. La cinétique des populations de cellules.
Ann. Biol. Clin., 26 , p. 793-823.

98 TUBIANA (M.), 1971 - The kinetics of tumour cell proliferation and radiotherapy.
Brit. J. Radiol., 44 , p. 325

99. TUBIANA (M.), et FRINDEL (E.), 1971. La cinétique des populations de cellules.
In "La cinétique de proliferation cellulaire" Séminaire INSERM p. 45-65.

100. VANT HOF (J.), 1965 - Discrepancies in mitotic cycle time when measured with tritiated thymidine and colchicine.
Exp. Cell Res., 37, p. 292-299.

101. VAN'T HOF (J.), 1965 - Relationships between mitotic cycle duration, S period duration, and the average rate of DNA synthesis in the root meristem cells of several plants -
Exp. Cell Res., 39, p. 48-58

102. VAN'T HOF (J.), 1966 - Comparative cell population kinetics of tritiated thymidine labeled diploid and colchicine induced tetraploid cells in the same tissue of Pisum .
Exp. cell Res., 41, p. 274-288

103. VAN'T HOF (J.), 1967 - Studies on the relationships between cell population and growth kinetics of root meristems.
Exp. Cell Res., 46, p. 335-347

104. VAN'T HOF (J.), 1968 - Experimental procedures for measuring cell population kinetic parameters in plant root meristems.
In Methods in Cell Physiology- PRESCOTT Ed., 3, p. 95-117.

105. VAN'T HOF (J.), 1968 - The action of IAA and Kinetin on the mitotic cycle of proliferative and stationary phase excised root meristems.
Exp. Cell Res., 51, p. 167-176.

106. VAN'T HOF (J.) et YING(H.K.), 1964, Relationship between the duration of the mitotic cycle, the rate of cell production, and the rate of growth of Pisum roots at different temperatures.
Cytologia (TOKIO), 29, p. 399-406.

107. WALKER (P.M.B.) et YATES (H.B.), 1952 - Nuclear component of dividing cells.
Proc. Roy. Soc. (LONDON), B, 140, p. 274-299.

108. WEBSTER (P.L.), 1967 - Cell cycle kinetics in meristems : Effect of colchicine and IAA.
Ph. D. thesis - Case Western Reserve University, Cleveland OHIO.

109. WILBER (D.E.), 1960. Duration of the nuclear cycle in Tradescantia paludosa root tips as measured with H^3 thymidine
Amer. J. Bot., 47, 10, p. 828-834.

110. WILBER (D.E.) et QUASTLER (H.), 1963. A ^{14}C and ^{3}H thymidine double labeling technique in the study of cell proliferation in Tradescantia root tips.
Exp. Cell Res., 30, p. 8-22.

111. WOODS (D.), 1941 - Mode of action of chemotherapeutic agents.
Nature, 148, p. 758.

112. YARBO (C.), MILLER (B.) et ANDERSON (C.E.), 1954.
Purifying pararosanilin for use in colorless Schiff reagent.
Stain technol., 29, p. 299-300.

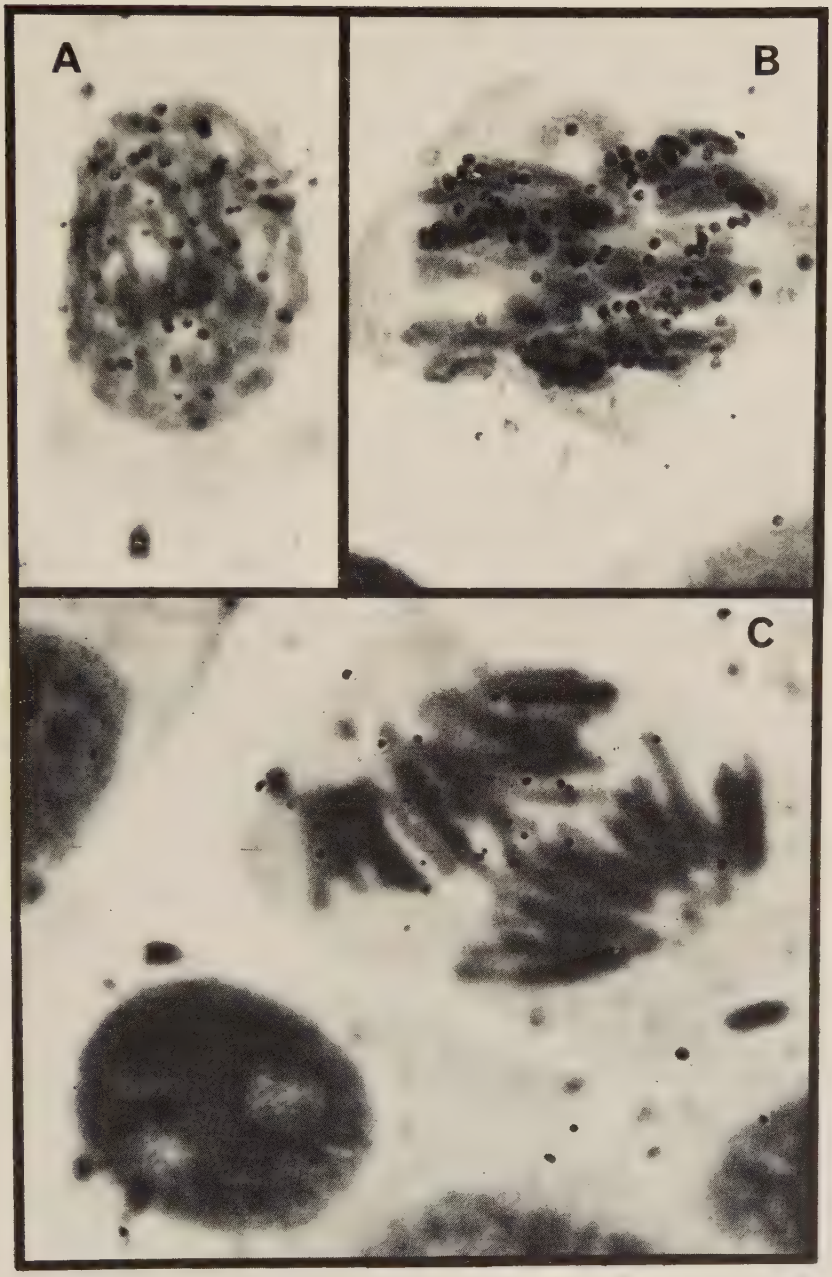
ASPECT DES CELLULES MERISTEMATIQUES RADICULAIRES d'ALLIUM SATIVUM L.

A : prophase marquée

B : métaphase marquée

C : en haut à droite, anaphase marquée

en bas à gauche, noyau au repos non marqué.


A
B
C